

UNIVERSITE DE SHERBROOKE
Faculté des sciences appliquées
Département de génie civil

BIOLIXIVIATION DES METAUX LOURDS DANS LES SOLS PAR LES
BACTERIES INDIGENES OXYDANT LE SOUFRE

Mémoire de maîtrise es sciences appliquées
Spécialité: génie civil

Eric GAGNON

Sherbrooke (Québec), CANADA

décembre 1996

RESUME

Dans les pays industrialisés, la contamination des sols par entre autres les métaux lourds est un problème d'actualité. Plusieurs solutions sont envisageables mais le traitement dont le but est de retirer le contaminant est l'option la plus intéressante.

Afin d'étudier l'enlèvement des métaux lourds toxiques des sols par biolixiviation, des bactéries indigènes pouvant oxyder le soufre ont été adaptées dans trois différents sols contaminés. L'adaptation a été effectuée en Erlenmeyers avec un mélange de sol et d'eau incubés sur un agitateur giratoire à la vitesse de 190 rpm et à la température de la pièce soit $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Du soufre élémentaire en poudre a été fourni comme substrat (source d'énergie) pour les bactéries et des nutriments sous forme de sulfate d'ammonium ont été ajoutés afin d'augmenter le taux d'oxydation du soufre par la microflore oxydant le soufre. La microflore a été adaptée en 1 à 4 transferts successifs et a permis de réduire le pH du sol sous la valeur de 2 par oxydation du soufre.

Après leur adaptation, pour des raisons techniques, les microflores ont été conservées pendant une période de six mois à 4°C et ont dues être réactivées pour les essais de biolixiviation. La méthode de réactivation a été la même que pour l'adaptation.

Les essais de biolixiviation ont été conduits à trois concentrations de sol soient 15, 35 et 55 g/l. Les résultats ont

montré que l'acidification du milieu par oxydation du soufre élémentaire permettait d'obtenir les taux de solubilisation suivants: Mn, (33-96%); Zn, (13-100%); Pb, (4-13%) et Cu, (63-79%). Les concentrations plus faibles de sol ont permis une meilleure efficacité d'enlèvement des métaux. Enfin, la solubilisation des métaux lourds dans les sols par le procédé de biolixiviation est fortement influencée par la spéciation, ce qui explique la diversité des résultats pour un même métal dans les différents sols.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes parents ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin aux essais ayant mené à la rédaction de ce mémoire.

Plus spécialement, je remercie mon directeur de travail, Monsieur K. Subba Narasiah pour ses précieux conseils et encouragements de même que pour l'initiative qu'il m'a accordé tout au long de mes recherches.

Je tiens également à souligner la précieuse assistance technique de M. Serge Bérubé, pour l'ensemble des essais en laboratoire, de M. Pierre Magny pour la partie du microscope électronique et de Mme Mariette Lambert pour l'analyse granulométrique.

Je tiens enfin à remercier très spécialement Sandra ainsi que notre chien Boule pour leur très grande patience et leurs encouragements continus tout au long de ma recherche.

TABLE DES MATIERES

	page
1. INTRODUCTION.....	1
2. PROBLEMATIQUE DES SOLS CONTAMINES.....	3
2.1 Source et impacts de la contamination aux métaux lourds..	3
2.2 Normes de la qualité des sols.....	6
2.3 Gestion des sols contaminés.....	9
2.3.1 Enfouissement sécuritaire.....	9
2.3.2 Traitements physico-chimiques.....	10
2.3.3 Traitements thermiques.....	12
2.3.4 Traitements biologiques.....	13
3. THEORIE DE LA BIOLIXIVIATION DES METAUX.....	14
3.1 Principaux mécanismes de la biolixiviation.....	14
3.2 Microorganismes biolixiviants.....	16
3.3 Utilisations de la biolixiviation.....	19
3.3.1 Industrie minière.....	19
3.3.2 Traitement des boues de station d'épuration.....	21
3.3.3 Traitement des sols.....	22
3.4 Besoins et objectifs de la recherche.....	23
4. EXPERIMENTATION.....	25
4.1 Choix des sols.....	25
4.2 Composition des sols.....	26
4.3 Adaptation de la microflore indigène oxydant le soufre...	31
4.4 Réactivation de la microflore indigène.....	35
4.5 Effets de la concentration de sol de l'inoculum.....	37
4.6 Contrôles témoins.....	37
4.7 Essais de biolixiviation.....	38
4.8 Analyse microscopique.....	40
5. ANALYSE ET DISCUSSION DES RESULTATS.....	42
5.1 Résultats de l'adaptation de la microflore.....	42
5.2 Résultats de la réactivation de la microflore.....	55
5.2.1 Survie des microflores adaptées.....	55
5.2.2 Réactivation.....	57
5.3 Effets de la concentration de sol de l'inoculum.....	68
5.4 Contrôles témoins.....	73
5.5 Biolixiviation.....	79
5.5.1 Variation du pH.....	79
5.5.2 Variation des sulfates.....	85
5.5.3 Solubilisation des métaux	89
5.5.4 Spéciation des métaux.....	105
5.5.5 Effets de la concentration de solides.....	108
5.6 Analyse au microscope électronique.....	112
Conclusions.....	116
Bibliographie.....	121

LISTE DES FIGURES

	page
Figure 4.1: Courbes de titration représentant la capacité tampon des sols étudiés.....	29
Figure 4.2: Courbes granulométriques des sols.....	30
Figure 4.3: Appareillage expérimental.....	33
Figure 4.4: Schéma de la méthode d'adaptation.....	34
Figure 4.5: Schéma de la méthode de réactivation.....	36
Figure 5.1: Schéma de l'historique de l'adaptation.....	43
Figure 5.2: Evolution du pH pendant l'adaptation du sol de Drummondville.....	44
Figure 5.3: Evolution du pH pendant l'adaptation du sol de Eustis.....	45
Figure 5.4: Evolution du pH pendant l'adaptation du sol de Sherbrooke.....	46
Figure 5.5: Evolution du pH pendant l'adaptation du sol de Montréal.....	47
Figure 5.6: Comparaison de la chute de pH avant et après adaptation	53
Figure 5.7: Vérification de la survie des microflores après 6 mois de conservation à 4°C.....	56
Figure 5.8: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Drummondville à 15 g/l.....	58
Figure 5.9: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Drummondville à 35 g/l.....	59

Figure 5.10: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Drummondville à 55 g/l.....	60
Figure 5.11: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Eustis à 15 g/l.....	61
Figure 5.12: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Eustis à 35 g/l.....	62
Figure 5.13: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Eustis à 55 g/l.....	63
Figure 5.14: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Sherbrooke à 15 g/l.....	64
Figure 5.15: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Sherbrooke à 35 g/l.....	65
Figure 5.16: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Sherbrooke à 55 g/l.....	66
Figure 5.17: Effet sur l'acidification du sol de Drummondville de la concentration de solide à laquelle l'inoculum a été préparé.....	69
Figure 5.18: Effet sur l'acidification du sol de Eustis de la concentration de solide à laquelle l'inoculum a été préparé.....	70
Figure 5.19: Effet sur l'acidification du sol de Sherbrooke de la concentration de solide à laquelle l'inoculum a été préparé.....	71
Figure 5.20: Contrôles témoins indépendants des sols.....	74
Figure 5.21: Contrôles témoins pour le sol de Drummondville....	76
Figure 5.22: Contrôles témoins pour le sol de Eustis.....	77

Figure 5.23: Contrôles témoins pour le sol de Sherbrooke.....	78
Figure 5.24: Variation du pH lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Drummondville.....	81
Figure 5.25: Variation du pH lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis.....	82
Figure 5.26: Variation du pH lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Sherbrooke.....	83
Figure 5.27: Variation des sulfates lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Drummondville.....	86
Figure 5.28: Variation des sulfates lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis.....	87
Figure 5.29: Variation des sulfates lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Sherbrooke.....	88
Figure 5.30: % d'enlèvement du manganèse lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Drummondville.....	91
Figure 5.31: % d'enlèvement du zinc lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Drummondville.....	92
Figure 5.32: % d'enlèvement du manganèse lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis.....	93
Figure 5.33: % d'enlèvement du zinc lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis.....	94
Figure 5.34: % d'enlèvement du plomb lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis.....	95
Figure 5.35: % d'enlèvement du cuivre lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis.....	96

Figure 5.36: % d'enlèvement du manganèse lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Sherbrooke.....	97
Figure 5.37: % d'enlèvement du zinc lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Sherbrooke.....	98
Figure 5.38: Comparaison des taux de solubilisation à 15 g/l...	102
Figure 5.39: Comparaison des taux de solubilisation à 35 g/l...	103
Figure 5.40: Comparaison des taux de solubilisation à 55 g/l...	104
Figure 5.41: Influence du % de solides sur la solubilisation...	111
Figure 5.42a: Photographie au microscope électronique des thiobacilles du sol de Drummondville.....	113
Figure 5.42b: Photographie au microscope électronique des thiobacilles du sol de Eustis.....	113
Figure 5.42c: Photographie au microscope électronique des thiobacilles du sol de Sherbrooke.....	114

LISTE DES TABLEAUX

	page
Tableau 2.1: Critères du MEF pour les métaux lourds.....	7
Tableau 3.1: Liste des espèces de thiobacilles.....	18
Tableau 4.1: Caractéristiques physico-chimiques des sols.....	28
Tableau 4.2: Concentration de métaux lourds dans les sols.....	28
Tableau 5.1: Variation du pH, production de sulfates et oxydation du soufre durant l'essai de biolixiviation.....	80
Tableau 5.2: Spéciation des métaux dans les sols étudiés.....	107

1. INTRODUCTION

Depuis quelques années, les fermetures et démolitions d'usines et de complexes industriels vétustes deviennent de plus en plus fréquentes, laissant ainsi de nombreux terrains inoccupés. Le recyclage de ces terrains est la solution la plus intéressante. Cependant, les usines ont souvent contaminé le sol que ce soit par leurs activités industrielles, par accident, par enfouissement de déchets ou pour tout autre raison. Une contamination fréquemment rencontrée est celle associée aux métaux lourds. L'enlèvement de ces éléments potentiellement toxiques est essentiel à la réhabilitation des anciens sites industriels en vue de leur réutilisation.

Les options disponibles en gestion des sols contaminés sont l'enfouissement sécuritaire et les traitements soient physico-chimiques, thermiques ou biologiques. Les traitements sont les solutions privilégiées car ils permettent la réutilisation inconditionnelle du sol. Cependant, avec la contamination par les métaux lourds, il n'existe pas de traitement thermique efficace et les méthodes physico-chimiques sont très coûteuses. La biolixiviation ou lixiviation bactérienne est un procédé biologique couramment utilisé pour l'extraction des métaux du minerai et des résidus miniers et est étudié depuis une vingtaine d'années pour l'enlèvement des métaux des boues de station d'épuration. Cependant, l'utilisation de cette technique pour le traitement des

sols contaminés avec des métaux lourds n'a pas été étudiée avant 1992.

Il existe deux approches principales en biolixiviation selon le substrat utilisé pour la croissance bactérienne soient celle utilisant le fer ionique (ex. sous forme FeSO_4) et celle utilisant le soufre élémentaire (S^0). Jusqu'à présent, en traitement des sols, seule la première approche a été étudiée et ce en raison du caractère récent des recherches dans ce domaine. La présente étude est donc consacrée au développement des connaissances de base en biolixiviation des métaux dans les sols avec le soufre comme substrat. L'expérimentation a consisté à démontrer la présence de microorganismes biolixiviant indigènes dans le sol et à les adapter pour démontrer leur potentiel d'enlèvement des métaux lourds dans les sols.

2. PROBLEMATIQUE DES SOLS CONTAMINES

2.1 Source et impacts de la contamination aux métaux lourds

Les métaux lourds comme le Pb, Cu, Zn, Mn, etc. se retrouvent de façon naturelle dans les sols en concentrations variées, parfois assez élevées. Cependant, en général, ce sont les activités humaines qui sont responsables des concentrations très élevées de métaux dans les sols. En Amérique du Nord, durant les dernières décennies, les industries ont utilisé et généré de nombreuses substances dangereuses dont les métaux lourds. Par manque de mesures de contrôle, des rejets ont fréquemment contaminé le sol environnant et l'eau souterraine. Ces rejets pouvaient et peuvent encore être dus à des activités normales d'opération, à un enfouissement sur place ou à des accidents. Les activités humaines qui ont contribué le plus à contaminer le sol avec des métaux lourds sont les industries minière, métallurgique, chimique et pétrochimique de même que l'agriculture, la foresterie et l'utilisation de combustibles fossiles [1,2].

A la suite du démantèlement de complexes industriels devenus vétustes, on se retrouve avec de nombreux terrains contaminés. Pour des raisons économiques, ces terrains sont convoités par de nombreux promoteurs qui désirent les exploiter [3]. Cependant, comme la contamination des sols affecte la chaîne alimentaire, l'eau souterraine, la santé publique et l'environnement, on se

retrouve devant un dilemme important. On a alors le choix entre deux options: on ferme ces sites et on interdit leur réemploi ou on permet la revalorisation des sols et le réemploi des anciens sites industriels. La première solution est peu attrayante car elle entraînerait la multiplication de zones interdites et nuirait à la maximisation du potentiel urbain. La deuxième solution paraît, des points de vue économique et environnemental, beaucoup plus rentable. Les avantages du recyclage d'anciens secteurs industriels sont nombreux. Il permet entre autre de préserver les terrains en périphérie de la ville pour d'autres usages comme l'agriculture, l'industrie forestière ou tout simplement comme milieu naturel. Il permet aussi de sauver des coûts d'installation de services (eau, électricité, etc.) déjà présents en milieu industriel, ce qui n'est pas le cas en périphérie. De plus, la création d'espaces verts, la disparition de terrains vagues et d'usines vétustes abandonnées et la densification du tissu résidentiel sont autant de facteurs permettant de hausser la qualité de vie des citoyens [3].

Il est pratiquement impossible de connaître la quantité réelle de terrains contaminés au Québec. En effet, la contamination des sols est d'un caractère diffus et elle n'est pas toujours visible [3]. De plus, les propriétaires de terrains contaminés sont peu intéressés à rendre public l'état de leur propriétés. Pour identifier les terrains dont les sols sont susceptibles d'être contaminés, il faut tenir compte du type d'activité qui y a été

praticqué [3]. Le Ministère de l'Environnement du Québec utilise des banques de données sur les terrains contaminés (GERSOL et GERLED) [4]. Selon les données de mai 1996, il y a contamination par les métaux de 294 terrains et 232 lieux d'enfouissement des déchets pour un total de 526 sites au Québec.

Les impacts de la contamination des sols peuvent être significatifs. Les métaux lourds contenus dans le sol peuvent: être absorbés par de jeunes enfants par ingestion ou contact cutané et leur causer des problèmes de santé, se fixer à des particules solides (poussières) et être inhalés, dégager des gaz nocifs, contaminer la nappe phréatique, s'infiltrer dans des réseaux de distribution d'eau, empêcher la croissance des arbres et des plantes (phytotoxicité), contaminer les produits de l'agriculture commerciale et des potagers domestiques, en plus de menacer toute la chaîne alimentaire. En fait, tous les métaux sont toxiques à l'être humain et aux autres animaux à des concentrations diverses, mais le degré de toxicité varie beaucoup selon le type de métal, la forme sous laquelle on le retrouve ou le type d'organisme intoxiqué [5]. Parmi les métaux qui sont toxiques à faible concentration, on retrouve Le cadmium, le cuivre, le mercure, le manganèse, le molybdène, le plomb et le zinc [6-10]. Le Be, V, Cr, Cd, Hg et Pb sont notables pour leurs effets toxiques chez l'être humain [11]. Le cadmium est particulièrement dangereux puisque les plantes sont capable d'accumuler et de tolérer des concentrations plusieurs fois plus élevées que l'homme. Ainsi, on peut le retrouver en

concentrations toxiques pour l'être humain dans les produits de consommation de l'agriculture [7]. Enfin, Le cuivre, le zinc et le nickel sont phytotoxiques et leurs concentrations élevées dans le sol peuvent affecter fortement le rendement des récoltes [5,7,12].

2.2 Normes de la qualité des sols

Afin de mesurer la gravité du niveau de contamination dans le sol, le Ministère de l'Environnement et de la faune a développé des critères indicatifs pour 8 classes de contaminants dont les métaux lourds [3]. Les critères sont présentés sous forme de grille comportant pour chaque contaminant trois valeurs seuils de concentration en ppm soient les valeurs A, B et C. Le tableau 2.1 présente les critères du MEF pour les métaux lourds.

Valeur A: C'est le seuil minimal de contamination des sols. On considère que sous ce seuil, le sol n'est pas contaminé. Il peut être réutilisé de façon inconditionnelle.

Plage A-B: À ce niveau, le sol est qualifié de faiblement contaminé. Il peut être réutilisé de façon conditionnelle par exemple comme matériau de remblayage dans une zone industrielle à condition de ne pas augmenter le niveau de contamination existant. On peut aussi l'envoyer dans un dépôt de matériaux secs ou l'utiliser comme matériau de recouvrement dans un lieu d'enfouissement sanitaire (LES)

Tableau 2.1: Critères du MEF pour les métaux lourds

**GRILLE DES CRITÈRES INDICATIFS DE LA CONTAMINATION
DES SOLS ET DE L'EAU SOUTERRAINE**

Version adoptée le 90-02-02

	SOLS mg/kg de matière sèche (ppm)			EAUX SOUTERRAINES (ppb) ug/L		
	A	B	C	A	B	C
I - MÉTAUX¹						
Argent (Ag)	2	20	40	5	50	200
Arsenic (As)	10	30	50	5	50	100
Baryum (Ba)	200	500	2000	50	1000	2000
Cadmium (Cd)	1,5	5	20	1	5	20
Cobalt (Co)	15	50	300	10	50	200
Chrome (Cr)	75	250	800	15	40	500
Cuivre (Cu)	50	100	500	25	500	1000
Étain (Sn)	5	50	300	10	30	150
Mercure (Hg)	0,2	2	10	0,1	0,5	1,0
Molybdène (Mo)	2	10	40	5	20	100
Nickel (Ni)	50	100	500	10	250	1000
Plomb (Pb)	50	200	600	10	50	100
Sélénium (Se)	1	3	10	1	10	50
Zinc (Zn)	100	500	1500	50	5000	10000
II - POLLUANTS MINÉRAUX						
NH ₄	N.A.	N.A.	N.A.	200	500	1500
Br dissous ²	N.A.	N.A.	N.A.	100	500	2000
Br disponible	20	50	300	N.A.	N.A.	N.A.
CN disponible	1	10	100	40	200	400
CN total	5	50	250	40	200	400
F dissous ²	N.A.	N.A.	N.A.	300	1500	4000
F disponible	200	400	2000	N.A.	N.A.	N.A.
PO ₄ (en P)	N.A.	N.A.	N.A.	50	100	700
NO ₃ (en N)	N.A.	N.A.	N.A.	10	10000	-
NO ₂ (en N)	N.A.	N.A.	N.A.	20	1000	-
Sulfure (H ₂ S)	N.A.	N.A.	N.A.	10	50	500
S total	500	1000	2000	-	-	-

Valeur B: Des analyses approfondies sont nécessaires à partir de ce seuil.

Plage B-C: Le sol est contaminé. S'il n'est pas décontaminé, il devra être soumis à des restrictions d'usages.

Valeur C: À partir de ce seuil, le sol est considéré comme très contaminé. Il peut y avoir nécessité d'une action correctrice dans un bref délai.

Plage > C: Tous les usages du sol devraient être restreints. Des études approfondies et des travaux de restauration sont généralement nécessaires.

Dans tous les cas, ces critères doivent être considérés comme indicatifs. Étant donné la nature hétérogène et complexe de la contamination des sols, chaque situation exige du cas par cas. Le choix d'intervention doit être fait en fonction entre autres de la nature et de la concentration des contaminants, de l'utilisation prévue du sol et de l'impact sur la nappe phréatique et sur l'environnement en général [3].

2.3 Gestion des sols contaminés

Il existe deux principaux modes d'intervention en matière de sols contaminés soient l'enfouissement sanitaire et les traitements (physico-chimiques, thermiques et biologiques). Les traitements permettent d'enlever le contaminant du sol ou de l'immobiliser sur place (l'isoler physiquement et/ou chimiquement). L'enlèvement des métaux lourds du sol est la solution la plus intéressante car elle permet la réutilisation du sol de façon inconditionnelle.

2.3.1 Enfouissement sécuritaire

L'enfouissement sécuritaire est une solution acceptable lorsque le traitement est impossible ou trop coûteux. Cependant, étant donné les risques de contamination de la nappe phréatique, des normes sévères de construction et de gestion des sites d'enfouissement doivent être respectées. C'est dans cette optique que le Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF) a publié un guide d'implantation et de gestion des lieux d'enfouissement des sols contaminés [13]. Ce mode de gestion n'est cependant pas le plus souhaitable car il est une solution transitoire et non définitive.

2.3.2 Traitements physico-chimiques

Les procédés de traitement physico-chimiques impliquent des étapes de séparation physique ou de changement de phase et des étapes de transformation chimique des contaminants. Ces types de traitement peuvent être appliqués avec du sol excavé ou in-situ. Les procédés in-situ nécessitent l'injection de liquides sous la surface du sol et sont donc limités par plusieurs facteurs tels la perméabilité du sol, la profondeur de la nappe phréatique et les caractéristiques du contaminant (solubilité, concentration, etc.).

Une des méthode physico-chimique les plus employée pour l'enlèvement des métaux lourds est le lessivage des sols. Cette technique nécessite l'emploi de solvants appropriés afin de réaliser l'extraction de contaminants de la phase solide (sol) à la phase aqueuse (solvant). Les solvants utilisés le plus fréquemment pour extraire les métaux lourds sont les acides [14-17] ainsi que les agents chélateurs comme l'EDTA et le NTA [1,15-18]. La méthode est efficace mais nécessite de très grandes quantités de solvant. L'utilisation de cette technique est limitée par son coût ainsi que par la difficulté de récupérer le solvant [15-17]. De plus, l'efficacité de la méthode peut être limitée par la non homogénéité du sol et d'autres conditions hydrogéologiques défavorables. Enfin, des réactions peuvent se produire entre le solvant et certains éléments du sol comme par exemple le calcaire avec les acides. [15]

Une autre méthode présentement à l'étude est le lessivage électro-cinétique. Ce procédé consiste en un transport des contaminants par l'application d'un courant électrique dans un sol saturé d'eau [17].

Finalement, on peut inclure dans ce groupe les méthodes de stabilisation/solidification. Ces techniques n'ont pas pour but d'enlever les contaminants du sol mais plutôt de réduire la mobilité et la toxicité des polluants. Dans les procédés de stabilisation, l'ajout de réactifs divers permet de diminuer la solubilité ou la mobilité des contaminants par l'altération chimique de ces derniers. Les méthodes de solidification confinent le contaminant dans une matrice solide, imperméable et résistante à l'érosion chimique et mécanique à l'aide de divers agents de solidification comme des matières podzoliques (chaux, calcaire, silicates, ciment, résines thermoplastiques, etc.). Les technologies utilisent généralement une combinaison des deux méthodes [15-17,19]. Ces méthodes sont adéquates pour les mélanges de métaux les plus variés. Cependant, les métaux ne sont ni enlevés, ni détruits, ni concentrés. De plus, le volume de sol contaminé est augmenté par ces techniques, ce qui augmente les problèmes liés à la disposition de ces sols.

2.3.3 Traitements thermiques

Les procédés de destruction thermique sont des technologies établies en matière de décontamination des sols utilisant la chaleur afin de détruire les contaminants dans les sols. Les principales technologies thermiques de décontamination des sols sont les fours rotatifs, les fours à radiations infrarouges, les réacteurs au plasma, les lits fluidisés et la pyrolyse. Cependant, malgré leur grande efficacité à détruire les composés organiques, ces méthodes sont inefficaces pour traiter les composés inorganiques et les métaux lourds. Par contre, il existe un type de procédé thermique, la vitrification, qui peut être utilisé afin d'immobiliser ces contaminants [15-17,20]. Le procédé permet, après chauffage jusqu'au point de fusion et refroidissement, de transformer le sol contaminé en un matériel vitrifié, stable et inerte ressemblant à de l'obsidienne. La vitrification peut être utilisée in-situ avec des électrodes et un courant électrique pour chauffer le sol à la profondeur et la température voulues. La technique peut aussi être utilisée avec du sol excavé dans des fours à haute température. Enfin une technologie plus récente utilise des fours rotatifs avec une torche au plasma [16,17].

2.3.4 Traitements biologiques

Il existe deux techniques biologiques d'enlèvement des métaux lourds dans les sols soit la biolixiviation, qui sera traitée au chapitre suivant, et la phytoréhabilitation. Cette dernière technique utilise des plantes capables d'accumuler et de tolérer de très fortes concentrations de métaux [21]. Cette méthode est encore à un stade expérimental.

3. THEORIE DE LA BIOLIXIVIATION DES METAUX

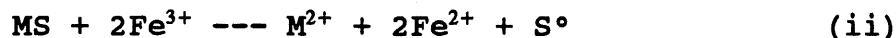
La biolixiviation consiste en l'utilisation de certains micro-organismes spécialisés pour lessiver, sous des conditions spécifiques, les métaux. Le phénomène en soit n'est pas nouveau. Depuis l'apparition de la vie sur terre il y a près de 4 milliards d'années, certaines bactéries proliférant naturellement en milieu minéral sont capables d'extraire les métaux en les faisant passer en solution. Ce phénomène d'extraction dans l'eau est ce que l'on appelle la lixiviation bactérienne [22]. Dans ce chapitre, il sera question des principaux mécanismes biochimiques de la biolixiviation, des microorganismes impliqués dans le processus de même que de l'utilisation actuelle du procédé. Enfin, les objectifs de cette étude seront présentés.

3.1 Principaux mécanismes de la biolixiviation

La solubilisation des métaux par biolixiviation peut être atteinte de façon directe par le métabolisme des bactéries ou indirecte par les produits de leur métabolisme [23-28]. Dans le mécanisme direct, les sulfures de métaux insolubles (MS) sont oxydés par les bactéries lixiviantes en sulfates solubles (MSO_4) selon l'équation simplifiée:



Ce mécanisme d'oxydation directe a été démontré pour plusieurs métaux comme le NiS, ZnS, CoS, PbS et CuS [25]. Dans le mécanisme indirect, les sulfures de métaux sont oxydés chimiquement par des ions ferriques:



Les ions ferreux produits par la réaction (ii) sont alors réoxydés par les bactéries ferrooxidantes (ex. T. ferrooxidans):



et le cycle d'oxydation du fer se répète. Ainsi, la réaction indirecte est due à la capacité métabolique qu'ont les bactéries ferrooxidantes de tirer leur énergie de l'oxydation de l'ion ferreux. Parallèlement, le soufre élémentaire produit dans l'équation (ii) est oxydé en acide sulfurique, ce qui favorise davantage la dissolution des métaux. L'équation qui décrit cette réaction est la suivante:



La plupart des espèces de thiobacilles peuvent être impliquées dans cette réaction [29]. Cependant, il est important de noter que même en l'absence de la réaction (ii), l'oxydation du soufre élémentaire peut se produire si ce substrat est présent

naturellement ou ajouté dans le milieu. T. thiooxidans oxyde le soufre élémentaire plus efficacement et rapidement que toute autre bactérie. Lorsque le soufre élémentaire est la seule source d'énergie, T. thiooxidans est définitivement prédominante et en un très court temps, le substrat est oxydé en acide sulfurique [28].

En plus du soufre élémentaire, les thiobacilles peuvent oxyder d'autres composés soufrés comme le sulfure d'hydrogène (H_2S), le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$), le trithionate ($S_3O_6^{2-}$) et le tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$) [27,30].

Enfin, il existe d'autres types de réaction comme la lixiviation du dioxyde de manganèse. Le MnO_2 n'est pas soluble dans l'acide sulfurique mais lorsque réduit en sulfate de manganèse par l'action indirecte de T.thiooxidans, il devient soluble [27]. Il est important de comprendre que les réactions en biolixiviation ne sont pas toutes similaires et dépendent du type de métal, des conditions du milieu, des organismes en présence et de plusieurs autres facteurs [27].

3.2 Microorganismes biolixiviants

Il existe plusieurs espèces de bactéries qui peuvent tirer l'énergie nécessaire à leur croissance de l'oxydation du soufre élémentaire ou de composés soufrés réduits. Cependant, les microorganismes du genre Thiobacillus semblent être les seuls isolés

jusqu'à présent possédant un système enzymatique permettant d'oxyder rapidement et efficacement le soufre élémentaire en conditions mésophiles [31]. On peut classer ces bactéries en deux catégories distinctes soient les thiobacilles peu acidophiles et les acidophiles [29,31,32]. Les peu acidophiles ont une croissance optimale à pH neutre (pH 6 à 8) et ne peuvent proliférer lorsque le milieu est acide (pH < 3). Par contre, les acidophiles peuvent croître à un pH inférieur à 3 mais pas en milieu neutre (pH > 5) [32,33]. Le tableau 3.1 présente les différentes espèces de thiobacilles.

Les thiobacilles sont des petites cellules gram-négatives en forme de bâtonnets ($\approx 0.5 \times 1.0-4.0 \mu\text{m}$). Elles tirent leur énergie de l'oxydation d'un ou plusieurs composés soufrés réduits. Toutes les espèces fixent le dioxyde de carbone et sont capables de croissance autotrophe. Certaines espèces sont obligatoirement chimiolithotrophes alors que d'autres peuvent aussi croître de façon chimioorganotrophique [32].

La distribution des thiobacilles est variée mais on retrouve généralement ces microorganismes dans des environnements riches en soufre ou en composés soufrés comme les sites miniers, les dépôts de soufre élémentaire, les aires de traitement des eaux usées, etc. [23,25,32,33]. On peut aussi les retrouver dans les eaux douces et salées [32,34], ainsi que dans différents types de sols [31,32].

Tableau 3,1: Liste des espèces de thiobacilles

Groupe de thiobacilles	Espèces
Non-acidophiles	<i>T. aquaesulis</i>
	<i>T. capsulatus</i>
	<i>T. delicatus</i>
	<i>T. denitrificans</i>
	<i>T. intermedius</i>
	<i>T. neapolitanus</i>
	<i>T. novellus</i>
	<i>T. perometabolis</i>
	<i>T. rubellus</i>
	<i>T. tepidarius</i>
	<i>T. thermophilica</i>
	<i>T. thioparus</i>
Acidophiles	<i>T. thyasiris</i>
	<i>T. versutus</i>
	<i>T. acidophilus</i>
	<i>T. albertis</i>
	<i>T. cuprinus</i>
	<i>T. ferrooxidans</i>
	<i>T. kabobis</i>
	<i>T. organoparus</i>
	<i>T. prosperus</i>
	<i>T. thiooxidans</i>

3.3 Utilisations de la biolixiviation

La biolixiviation permet de nombreuses applications économiques et environnementales dont des technologies établies comme la désulfurisation du charbon [25,35-38] ou d'autres combustibles fossiles [39,40] afin de réduire les émissions de dioxyde de soufre lors de la combustion. La désulfurisation biologique du gaz naturel [41] ainsi que des cendres et scories de différent types de déchets industriels [42] est aussi réalisable. Enfin, la décontamination biologique (avec T. ferrooxidans) de sédiments fluviaux pollués par les métaux lourds a été récemment étudiée [43]. Il existe de nombreuses autres applications de la biolixiviation démontrant le grand potentiel de cette technologie. Cependant, trois applications particulières seront vues plus en détail.

3.3.1 Industrie minière

Depuis de nombreuses années, la biolixiviation est pratiquée à travers le monde dans l'industrie minière pour la récupération des métaux à partir de minerai et de résidus miniers [22,23,25,44-46]. Jusqu'à présent, la technologie a été le plus souvent associée à la récupération de cuivre et d'uranium. Les bactéries autotrophes de type T. ferrooxidans et T. thiooxidans, seraient responsables de l'extraction de 25% du cuivre aux Etats-Unis [25,47] et de plus de 10% du cuivre mondial [22]. Cependant,

d'autres avenues semblent prometteuses comme la récupération du Zn, Pb, Co, Cd, Ni, Mn, Cr ainsi que de plusieurs autres métaux par biolixiviation de minerai et résidus miniers [25,45-47]. La récupération de métaux précieux comme l'or et l'argent est aussi à l'étude malgré la forte toxicité de l'argent pour T. ferrooxidans [25,45,49]. D'ailleurs, la biolixiviation permet d'améliorer le rendement d'extraction de métaux précieux prisonniers de gangues sulfurées [22,49]. Enfin, les déchets de l'industrie du raffinage des métaux peuvent aussi être soumis à la biolixiviation avec succès [46-48]. Il existe présentement deux techniques principales de lixiviation bactérienne dans l'industrie minière. La méthode la plus traditionnelle consiste à disposer le minerai en tas sur des surfaces imperméabilisées. Ces tas sont arrosés par des solutions de lixiviation qui peuvent être acidifiées, oxygénées ou enrichies en nutriments pour favoriser l'action des thiobacilles. Les solutions sont ensuite recueillies et traitées chimiquement ou électriquement pour en extraire le métal. L'autre méthode est un procédé in-situ qui consiste à arroser les couches de minerai dans des galeries et à récupérer la solution par pompage dans les galeries inférieures afin de la traiter [22,44].

La récupération des métaux est sans contredit l'intérêt industriel le plus important de l'utilisation des thiobacilles.

3.3.2 Traitement des boues de station d'épuration

L'épandage des boues provenant du traitement des eaux usées municipales sur les terres agricoles est une méthode de revalorisation intéressante mais leur contenu en métaux lourds est problématique. Les méthodes chimiques étant coûteuses, on étudie depuis quelques années la possibilité d'utiliser la biolixiviation comme méthode d'enlèvement des métaux lourds dans les boues.

Les premières études de biolixiviation des boues ont été réalisées dans des Erlenmeyers par Schönborn et Hartmann [50]. Les souches de bactéries utilisées étaient T. ferrooxidans et T. thiooxidans et un substrat (S^0 , FeS, CuS) devait être ajouté. De plus, le pH devait être ajusté au préalable à une valeur inférieure à 5. Wong et Henry [24,51] ont par la suite démontré que la biolixiviation avec T. ferrooxidans et des boues digérées anaérobies pouvait être effectuée sans ajout de substrat, le milieu de culture étant préajusté à 4,0. Les thiobacilles utilisaient les sulfures de métaux présents dans les boues comme substrat.

Depuis quelques années, la biolixiviation avec T. ferrooxidans et des cultures mixtes de T. ferrooxidans et T. thiooxidans, utilisant le $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ comme substrat a été largement étudiée en Erlenmeyers et dans différents types de réacteurs [28,52-60]. Par contre, l'utilisation de soufre élémentaire comme substrat à la place de l'ion ferreux est plus récente. Les

premiers travaux ont permis de constater qu'avec ce procédé, l'acidification initiale de la boue n'était pas nécessaire [61]. Ceci serait dû à une coopération entre les thiobacilles peu acidophiles comme T. thioparus et les acidophiles comme T. thiooxidans, les premiers abaissant le pH de la boue jusqu'à environ 4 et les seconds faisant chuter le pH de 4 à des valeurs inférieures à 2 [62-63]. Blais et al. [63] ont aussi démontré qu'il est possible d'adapter les microorganismes indigènes de la boue pour la biolixiviation des métaux avec comme substrat le soufre élémentaire. Les rendements de solubilisation obtenus par cette méthode étaient: Cd 83-96%, Cr 16-54%, Cu 85-87%, Mn 91-94%, Ni 78-79%, Pb 28-46% et Zn 82-96% [63]. Plusieurs paramètres ont aussi été étudiés comme la température, la concentration de solides dans les boues et le pH initial du milieu [64-66] de même que les aspects microbiologiques du procédé [31].

3.3.3 Traitement des sols

Jusqu'à présent, l'utilisation de la biolixiviation dans le but d'enlever les métaux lourds dans les sols contaminés a été très peu étudiée mais semble fort prometteuse. Zagury et al [67] ont déjà démontré qu'il est possible d'adapter en Erlenmeyers (mélange sol-eau) la microflore indigène des sols avec comme substrat du sulfate de fer ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et ce pour différents types de sols. Une fois adaptée, cette microflore peut effectuer la biolixiviation des métaux lourds permettant ainsi de décontaminer les sols. Le pH

initial du mélange sol-eau doit cependant être abaissé à environ 4,7 pour permettre la croissance des bactéries ferroxidantes. Les rendements de solubilisation après 10 jours de lixiviation ont été de l'ordre de 35-66% pour le cuivre, 35-97% pour le manganèse et 18-96% pour le zinc.

3.4 Besoins et objectifs de la recherche

L'utilisation du soufre élémentaire comme substrat et l'adaptation d'une microflore oxydant le soufre n'ont pas encore été étudiées en traitement des sols, la recherche dans ce domaine étant trop récente. Les caractéristiques visées par cette méthode sont d'obtenir une microflore fonctionnelle à partir d'un pH initial du sol le plus élevé possible, capable d'atteindre des niveaux de solubilisation des métaux acceptables pour la disposition et la réutilisation des sols, capable d'utiliser un substrat peu coûteux pouvant être transporté et entreposé facilement pour la croissance bactérienne et étant peu influencée par les caractéristiques physicochimiques des sols (huiles et graisses, matière organique, concentration de métaux, etc.) et les variations du milieu (température, pH, concentration de solides, activité des microorganismes hétérotrophes).

Afin de vérifier si l'utilisation du soufre élémentaire comme substrat en biolixiviation des métaux dans les sols a un potentiel intéressant, certaines expérimentations de base doivent être effectuées. Les objectifs de cette recherche sont donc:

- (a) de démontrer la présence de microorganismes indigènes capable d'oxyder le soufre élémentaire, comme T. thiooxidans et T. thioparus, pour permettre la biolixiviation dans divers types de sols contaminés par des métaux lourds,
- (b) d'adapter ces microflore indigènes pour la biolixiviation des métaux lourds et montrer qu'elles permettent une décontamination efficace des sols,
- (c) d'étudier les effets d'un paramètre soit la concentration en solides dans le mélange sol-eau sur l'acidification et sur la solubilisation des métaux lourds.

4. EXPERIMENTATION

4.1 Choix des sols

Quatre sols de différentes provenances ont été choisis pour fins d'expérimentation. Le choix de ces sols a été motivé par leurs concentrations suffisamment élevées en métaux lourds. Même si plusieurs terrains contiennent de fortes concentrations de métaux lourds au Québec, il demeure difficile de s'approprier des sols contaminés en raison de la crainte qu'ont les propriétaires de terrains de voir des résultats d'analyse compromettants être publiés. Ainsi, des quatre sols choisis, trois ont une provenance confidentielle. Ce sont les sols de Drummondville, Sherbrooke et Montréal. Le sol de Montréal provient du terrain d'une usine de métallurgie. Le quatrième sol a été échantillonné en Estrie près de la mine Eustis en bordure de la rivière Massawippi. Dans ce mémoire, les sols seront nommés selon leur provenance soit Drummondville, Eustis, Sherbrooke et Montréal.

Tous les sols, excepté celui d'Eustis, ont été échantillonnés par le fournisseur et les méthodes d'échantillonnage n'ont pas été contrôlées. Le sol d'Eustis a été recueilli à 20 cm de profondeur dans des sacs de polypropylène selon la méthode du Ministère de l'environnement du Québec [68]. Par la suite, les sols ont été conservés dans des bouteilles de polypropylène hermétiquement fermées. La température de conservation des sols avant leur utilisation était d'environ 4°C.

4.2 Composition des sols

Une caractérisation partielle des sols a été effectuée afin de différencier les quatre sols. Les caractéristiques chimiques qui ont été étudiées sont le pH, l'azote total, le pourcentage de matières volatiles, le phosphore total, les huiles et graisses ainsi que la concentration en métaux lourds. La capacité tampon de chacun des sols a aussi été vérifiée. Enfin, une classification des sols a été effectuée par analyse granulométrique. Les méthodes utilisées pour chacune de ces analyses sont les suivantes:

- pH: dans l'eau distillée selon la méthode d'Agriculture Canada [69]
- azote total: à l'aide d'un appareil à TKN (total Kjeldahl nitrogen) de marque Büchi.
- matières volatiles: d'après le manuel Standard methods de l'APHA [70]
- phosphore total: selon la méthode de l'APHA [70]
- huiles et graisses: à l'aide d'un appareil SFE de marque Suprex

Les résultats de ces analyses sont présentés au tableau 4.1.

L'analyse des métaux a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique Varian, modèle AA-1275. Les échantillons de sol ont été préalablement digérés dans l'acide nitrique (HNO_3), fluorhydrique (HF) et perchlorique (HClO_4) selon la procédure de l'APHA. [70]. Les résultats de l'analyse des métaux sont présentés au tableau 4.2.

La capacité tampon a été déterminée selon la méthode développée par Federer et Hornbeck [71]. Les courbes de titration (pH obtenu après 24 heures en fonction de la quantité d'acide ajoutée) représentant la capacité tampon, ou capacité de résister à des changements de pH, sont présentées à la figure 4.1. Il est intéressant de connaître cette capacité étant donné que le principe de la biolixiviation des métaux avec le soufre comme substrat est basé principalement sur une acidification et donc un changement de pH du milieu. Plus la courbe de titration est horizontale, plus la capacité est forte. On remarque que le sol de Montréal a une capacité tampon largement supérieure aux autres. Le sol de Drummondville vient au second rang et les sols de Eustis et Sherbrooke possèdent les capacités les plus faibles.

Enfin, les résultats de la classification granulométrique sont présentés à la figure 4.2. L'analyse des particules fines (argiles, silts) a été effectuée par sédimentométrie et celle des

TABLEAU 4.1: Caractéristiques physico-chimiques des sols

Sols	Drummondville	Eustis	Sherbrooke	Montréal
pH	8,07	5,67	5,93	8,12
TKN (mg Kg ⁻¹)	1437	2145	394	688
Solides volatiles (%)	4,8	6,7	3,4	4,4
Phosphore total (mg Kg ⁻¹)	54	33	99	20
Huiles et graisses (mg Kg ⁻¹)	4031	285	22655	1974

TABLEAU 4.2: Concentration de métaux lourds dans les sols(mg Kg⁻¹)

sols	Drummondville	Eustis	Sherbrooke	Montréal
Zn	98	1213	459,5	568
Mn	555	343	152	485
Cu	n.d.	1490	n.d.	17650
Pb	n.d.	3028	n.d.	1100
Ni	n.d.	n.d.	n.d.	3600
Cd	n.d.	n.d.	n.d.	8,8

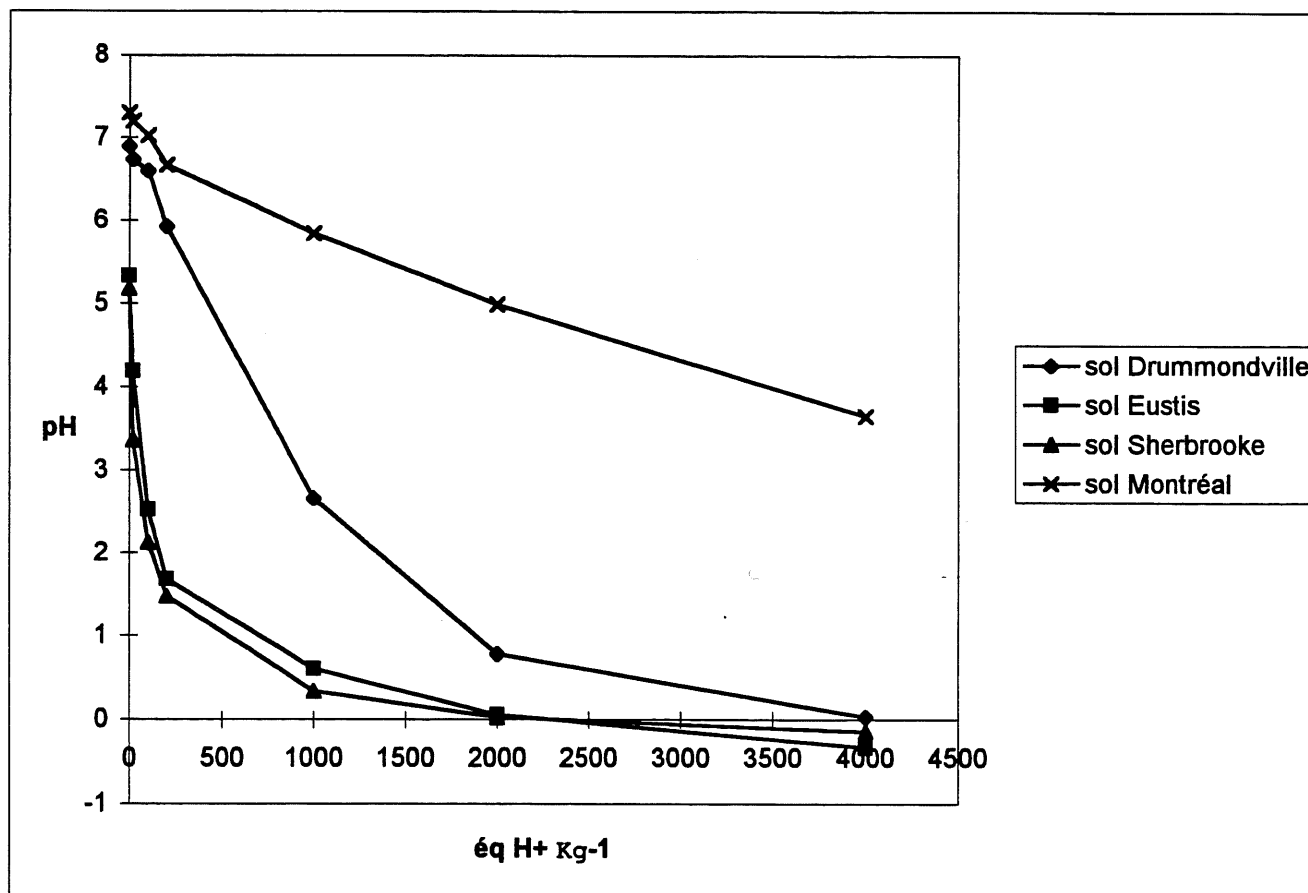


Figure 4.1: Courbes de titration représentant la capacité tampon des sols étudiés

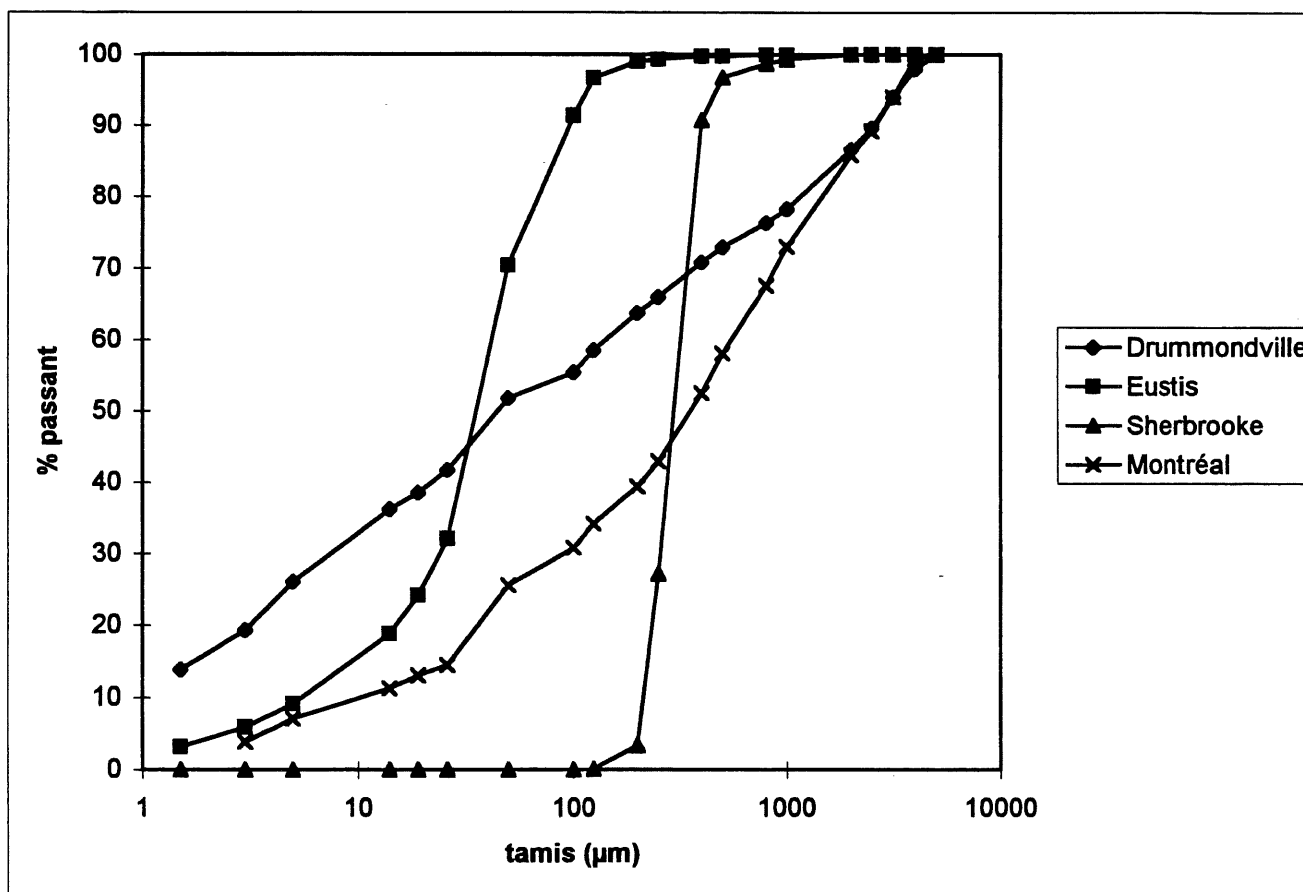


Figure 4.2: Courbes granulométriques des sols

particules grossières (sables, graviers) par tamisage.

4.3 Adaptation de la microflore indigène oxydant le soufre

La concentration de sol choisie pour l'adaptation était d'environ 15 à 20 g/l. Cette valeur a été choisie d'après Zagury et al [67] ainsi que Blais et al.[63]. Ainsi, une quantité de chacun des quatre sols a été transférée avec 150 ml d'eau dans des Erlenmeyers de 500 ml afin d'obtenir la concentration désirée. A ce mélange fut incorporé 1 % (poids/volume) de soufre élémentaire en poudre soit 1,5 g par Erlenmeyer. Afin de prévenir une évaporation trop importante de l'eau des mélanges, et donc une variation temporelle de la concentration de sol, les Erlenmeyers ont été fermés à l'aide de bouchons en mousse de polyuréthane. Ces bouchons permettent cependant un échange gazeux suffisant pour que les microorganismes bénéficient d'un apport adéquat en oxygène et en gaz carbonique. Grâce à ces bouchons, l'évaporation fut réduite à une valeur négligeable.

Chacun des Erlenmeyers ont par la suite été installés sur un agitateur de modèle G2, New Brunswick Scientific co. La vitesse de rotation fut fixée à 200 révolutions par minute d'après Blais et al. [63] puis elle a dû être réduite à 190 rpm pour des raisons techniques. La température d'incubation a été fixée pour des raisons techniques à environ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ soit la température de la pièce dans le laboratoire. Cette température est près de la température optimale pour T. thiooxidans et T. thioparus ($25-30^{\circ}\text{C}$)

[32]. Blais et al. [64] ont aussi démontré que le procédé utilisant le soufre comme substrat était plus efficace à 28°C qu'à 21°C mais équivalent à 35°C. Donc la température optimale se trouve entre 21°C et 28°C. Le pH était mesuré régulièrement avec un appareil portatif de modèle Hach one, Hach Company afin de suivre sa chute progressive. La figure 4.3 montre une photographie de l'appareillage expérimental. Après une acidification initiale due à l'action des microorganismes, la technique d'adaptation, développée par Blais et al. [63], consistait en l'inoculation de 10 % de sol acidifié dans un milieu frais donc dans un autre Erlenmeyer contenant les mêmes éléments que le précédent. Ce nouveau mélange était alors incubé dans les mêmes conditions de température et de vitesse de rotation que pour l'acidification initiale et le processus d'acidification pouvait recommencer avec une efficacité supérieure, les bactéries s'adaptant progressivement au milieu. Ces transferts furent répétés successivement jusqu'à ce que la vitesse de chute du pH initial des mélanges soit maximisée entre deux transferts successifs. Lorsque cet état est atteint, la flore microscopique oxydant le soufre peut être considérée comme étant adaptée au type de milieu auquel elle est soumise. La figure 4.4 montre un schéma représentant la procédure d'adaptation.



Figure 4,3: Appareillage expérimental

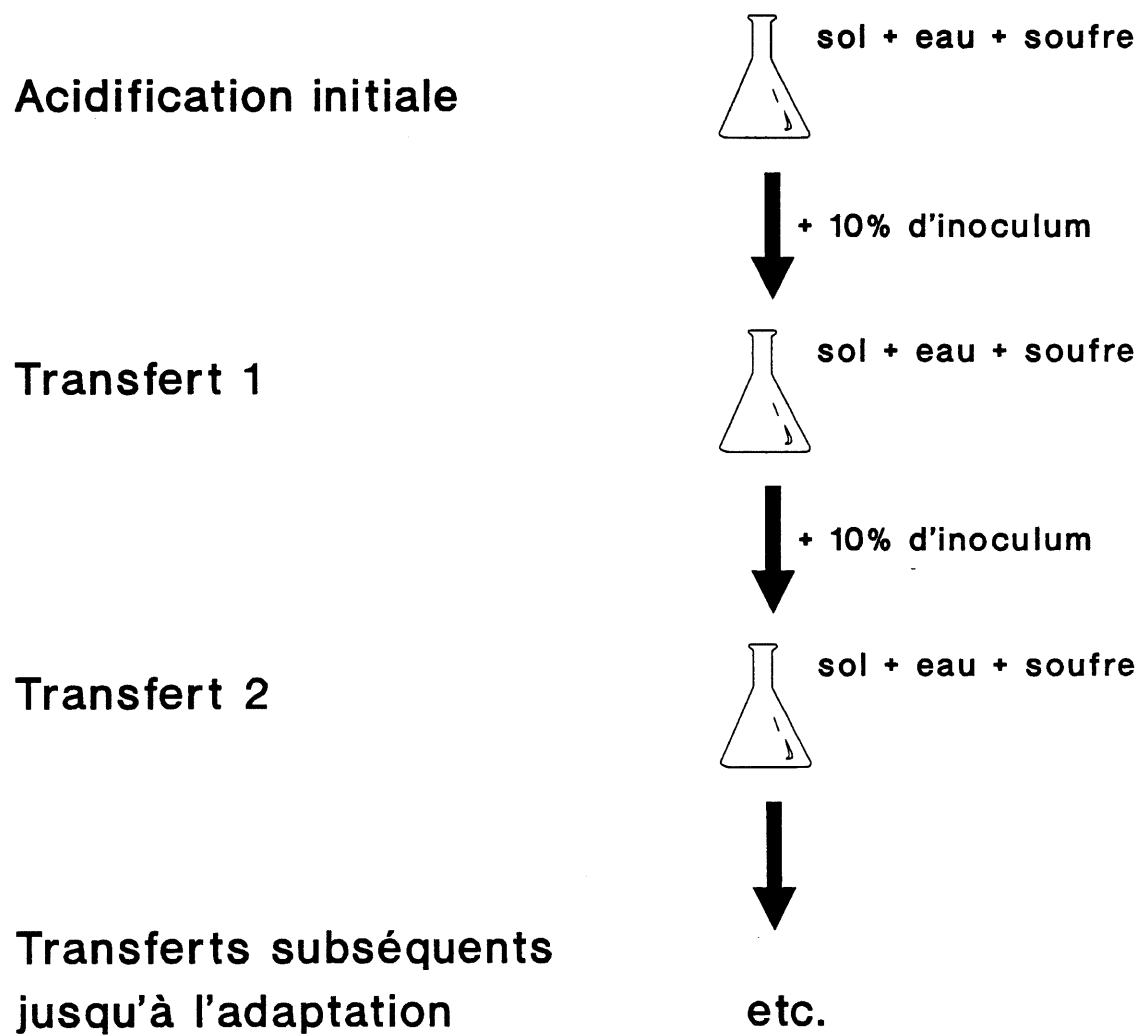


Figure 4.4: Schéma de la méthode d'adaptation

4.4 Réactivation de la microflore indigène

En raison de circonstances hors expérimentales, les essais durent être suspendus pour une période de six mois. Afin de conserver les souches adaptées, un dernier transfert a été effectué et pendant la période de croissance logarithmique des microorganismes, les Erlenmeyers ont été retirés de l'agitateur et conservés au réfrigérateur à une température d'environ 4°C. Les bactéries oxydant le soufre étant généralement mésophiles, le métabolisme devait en principe être suffisamment réduit pour que les bactéries survivent à une certaine période sans manquer de nutriments ou autres éléments essentiels. Par contre, aucune information connue ne permettait d'assurer que la microflore survivrait à une si longue période.

Pour la réactivation des souches bactériennes, trois concentrations de solides ont été choisies pour préparer les mélanges sol-eau afin de vérifier l'influence de cette caractéristique, soient 15 g/l, 35 g/l et 55 g/l. Le choix de 55 g/l a été motivé par certains résultats préliminaires qui semblaient indiquer que c'était la concentration maximale à laquelle il était possible d'adapter la microflore. 35 g/l est une valeur médiane entre 55 g/l et la concentration de l'adaptation de 15 g/l. La figure 4.5 montre un schéma représentant la procédure de réactivation. Un premier essai a été effectué en utilisant 10% d'inoculum provenant des souches respectives de chaque sol

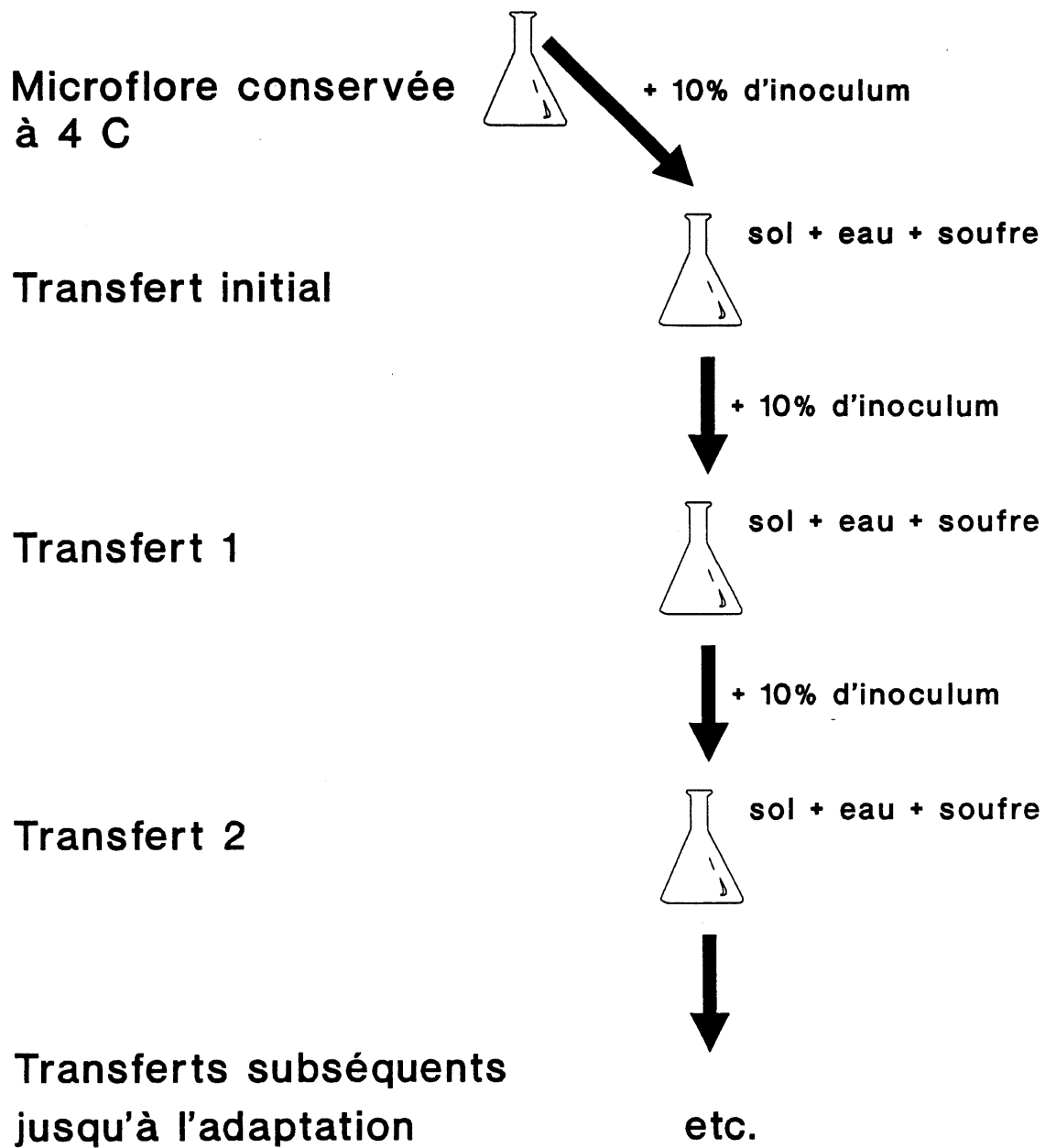


Figure 4.5: Schéma de la méthode de réactivation

conservées au réfrigérateur. Par la suite, des transferts successifs ont été effectués suivant la méthode utilisée précédemment jusqu'à ce que les bactéries soient réactivées. Les trois concentrations pour chaque sol ont été adaptées séparément c'est à dire que lors d'un transfert, l'inoculum ajouté à un mélange contenant 15 g/l de sol provenait de l'acidification précédente d'un mélange de 15 g/l de sol et ainsi de suite pour les concentrations de 35 et 55 g/l.

4.5 Effets de la concentration de sol de l'inoculum

Afin de vérifier l'importance d'adapter la microflore indigène à des concentrations différentes, un test comparatif a été effectué pour chacun des sols. Deux Erlenmeyers contenant un mélange à 15 g/l de sol ont été inoculés l'un avec une souche adaptée à 15 g/l et l'autre avec une souche adaptée à 55 g/l. De même, deux mélanges à 55 g/l ont été inoculés de façon similaire. Le pH a ensuite été mesuré pendant l'acidification afin de comparer son évolution et permettre de déterminer l'importance de la concentration de sol de l'inoculum lors de l'inoculation des microflores oxydant le soufre à un sol frais.

4.6 Contrôles témoins

Pendant l'expérimentation, divers types de contrôles témoins ont permis de vérifier plusieurs hypothèses quant à la cause de

l'acidification. Les premiers témoins sont un mélange d'eau et de soufre ainsi que d'eau, de soufre et de sulfate d'ammonium $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. Ces témoins permettent de vérifier la présence ou l'absence d'une oxydation du soufre par l'air. Un autre type de témoin vérifié est un mélange de sol et d'eau. Ce témoin permet de vérifier l'importance du substrat (soufre) dans l'expérimentation. Un des contrôles les plus importants consiste à mélanger sol, eau, soufre et nutriments dans un Erlenmeyer et à stériliser le tout pendant 12 minutes dans un autoclave, modèle Steril-Quik de marque National, a Weinicke Company, à température de 121°C. Ce contrôle a pour but de vérifier si l'acidification des mélanges est due à une oxydation microbiologique seulement ou si une oxydation chimique est aussi impliquée. Enfin, le dernier type de témoin a pour but de vérifier si un autre type d'oxydation notamment celle du fer ionique par l'espèce Thiobacillus ferrooxidans n'est pas impliqué dans cette expérimentation. Pour ce faire, un Erlenmeyer contenant eau, sol et nutriments mais sans soufre élémentaire est inoculé avec 10% d'un mélange adapté.

4.7 Essais de biolixiviation

Afin de vérifier la capacité de la flore oxydant le soufre de solubiliser les métaux comme zn, mn, pb et cu, un essai de biolixiviation a été effectué pour chacun des sols expérimentés sauf pour celui de Montréal dont l'adaptation de la microflore oxydant le soufre n'a pas été possible. Les trois concentrations

de sol qui ont été choisies étaient les mêmes que lors de la réactivation soient 15 g/l, 35 g/l et 55 g/l. A chacune de ces concentrations correspond deux duplicatas et un contrôle témoin pour un total de neuf Erlenmeyers. Les quantités de sol requises pour obtenir les concentrations voulues, soient 2,25 g, 5,25 g et 8,25 g, ont été mélangées avec 150 ml d'eau et transférées dans des Erlenmeyers de capacité de 500 ml. A ce mélange fut ajouté 2% (0,3 g) de nutriments sous la forme de sulfate d'ammonium $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. Puis, 1% de soufre élémentaire a été ajouté aux duplicatas mais non aux contrôles témoins.

Chacun des Erlenmeyers ont été inoculés avec 10 % de microflore adaptée à leur type de sol respectif. Afin d'homogénéiser la procédure d'inoculation, une quantité suffisante de mélange adapté à 55 g/l a été transférée dans un Bécher puis soumise à agitation à l'aide d'un agitateur magnétique. De ce Bécher, 15 ml ont ensuite été retirés et inoculés à chacun des Erlenmeyers appropriés. De plus, trois échantillons de 10 ml d'inoculum ont été centrifugés à 3000 g pendant 40 minutes, la phase liquide étant conservée pour fins d'analyse des métaux et des sulfates.

Les Erlenmeyers ont par la suite été incubés sur un agitateur giratoire à la température du laboratoire soit $23 \pm 2^\circ\text{C}$ et à une vitesse de rotation de 190 rpm comme lors de l'adaptation. L'agitation était maintenue sans interruption sauf lors des

échantillonnages. Le pH était mesuré régulièrement tout au long de l'essai. Afin de suivre l'évolution de la solubilisation des métaux lourds dans les mélanges, des échantillons de 10 ml ont été soutirés périodiquement des Erlenmeyers. Pour ce faire, l'agitation était suspendue pendant 15 minutes pour permettre aux particules solides de se déposer. Par la suite, à l'aide de pipettes, l'échantillon de surnageant était retiré puis centrifugé à 3000 g pendant 40 minutes à l'aide d'une centrifugeuse, modèle Medifuge de Canlab, afin de séparer les solides du liquide. Enfin la partie liquide était conservée à 4°C pour fins d'analyses chimiques dont la concentration de métaux lourds et celle des sulfates. La concentration en métaux lourds a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique, modèle AA-1275 series de Varian et la concentration en sulfates a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à lecture directe, modèle DR-2000 de Hach Company.

Afin de conserver la concentration de solides stable tout au long de l'essai, la quantité d'eau enlevée lors de l'échantillonnage était remplacée par une quantité équivalente d'eau déionisée soit 10 ml.

4.8 Analyse microscopique

Afin de confirmer la présence de thiobacilles, un examen microscopique des microflores adaptées a été effectué. Les bactéries en suspension, échantillonnées à même les Erlenmeyers,

ont tout d'abord été préparées de la façon suivante.

Les bactéries en suspension ont été diluées dans un rapport de 1:5 avec de l'eau distillée et filtrée (filtre millipore 0.22μ).

Après dilution, les suspensions de bactéries ont été centrifugées quelques secondes puis suspendues à nouveau dans de la glutaraldéhyde 2,5% tamponnée avec du cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,2 pendant 30 minutes à 4°C pour fixation.

Ensuite, les bactéries ont été centrifugées et lavées 3 fois avec le tampon cacodylate de sodium 0,1M.

Après ces lavages, les bactéries ont été resuspendues dans du tétroxyde d'osmium 1% (tamponné avec du cacodylate de sodium 0,1M à pH 7,2) et post-fixées pendant 24h à 4°C.

La post-fixation a été suivie de 3 lavages de 10 minutes chacun avec le tampon cacodylate. Les bactéries ont ensuite été filtrées sur filtre Nuclépore $0,4\mu$, et déshydratées dans une série ascendante d'éthanol de 50 à 100% par étapes de 10 minutes.

Enfin, les bactéries sur filtre ont été séchées à l'air et les filtres ont été montés sur un support d'aluminium pour être métallisés avec une couche de 150\AA d'or/palladium. L'examen des microorganismes a été réalisé à l'aide d'un microscope électronique à balayage JEOL JSM-840A sous une tension de 10 à 20 kilovolts.

5. ANALYSE ET DISCUSSION DES RESULTATS

5.1 Résultats de l'adaptation de la microflore

L'adaptation de la microflore oxydant le soufre dans les sols consistait, comme décrit précédemment, en plusieurs acidifications successives. La figure 5.1 montre un schéma de l'historique de l'adaptation. Afin de permettre la croissance des microorganismes, une quantité de sol a été ajoutée dans des Erlenmeyers à 150 ml d'eau déionisée afin d'obtenir une concentration d'environ 15 g/l. La source d'énergie, ou substrat, fournie était le soufre élémentaire en poudre en concentration de 1% (poids/volume).

Les figures 5.2 à 5.5 montrent l'évolution du pH des différentes étapes de l'adaptation pour les sols de Drummondville, Eustis, Sherbrooke et Montréal respectivement. On remarque que pour les trois premiers essais (essai 1, essai 2 et essai 3), la chute de pH est significative mais très lente pour les sols de Drummondville et Eustis alors qu'elle est négligeable dans le cas des sols de Sherbrooke et Montréal.

En plus du soufre comme substrat (ou source d'énergie), de l'eau, de l'oxygène et de la source de carbone (CO_2 atmosphérique pour les autotrophes), certains nutriments et métaux-trace sont essentiels à la croissance des microorganismes autotrophes. Pelczar et Reid [72] indiquent la concentration nécessaire en

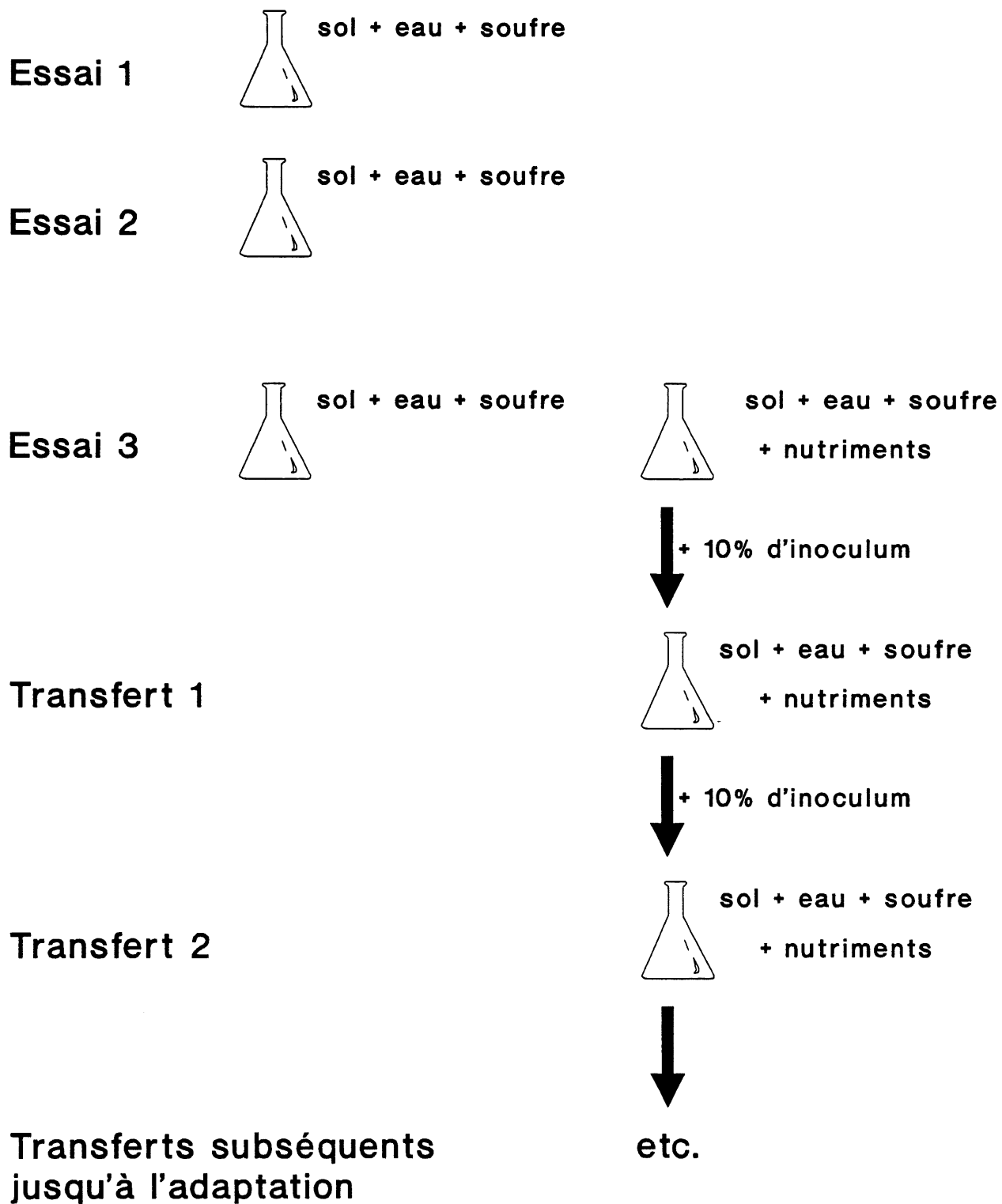


Figure 5.1 Schéma de l'historique de l'adaptation

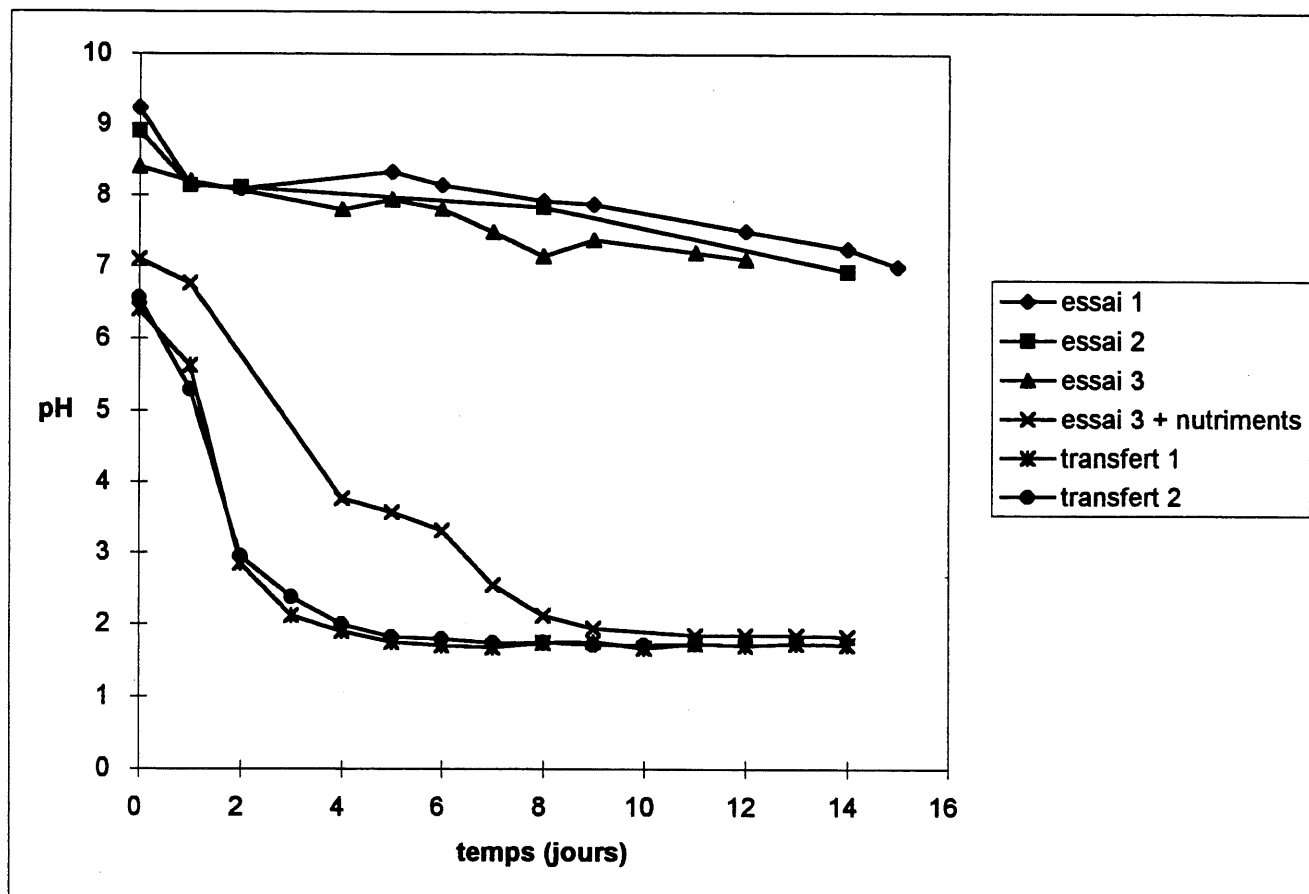


Figure 5.2: Evolution du pH pendant l'adaptation du sol de Drummondville

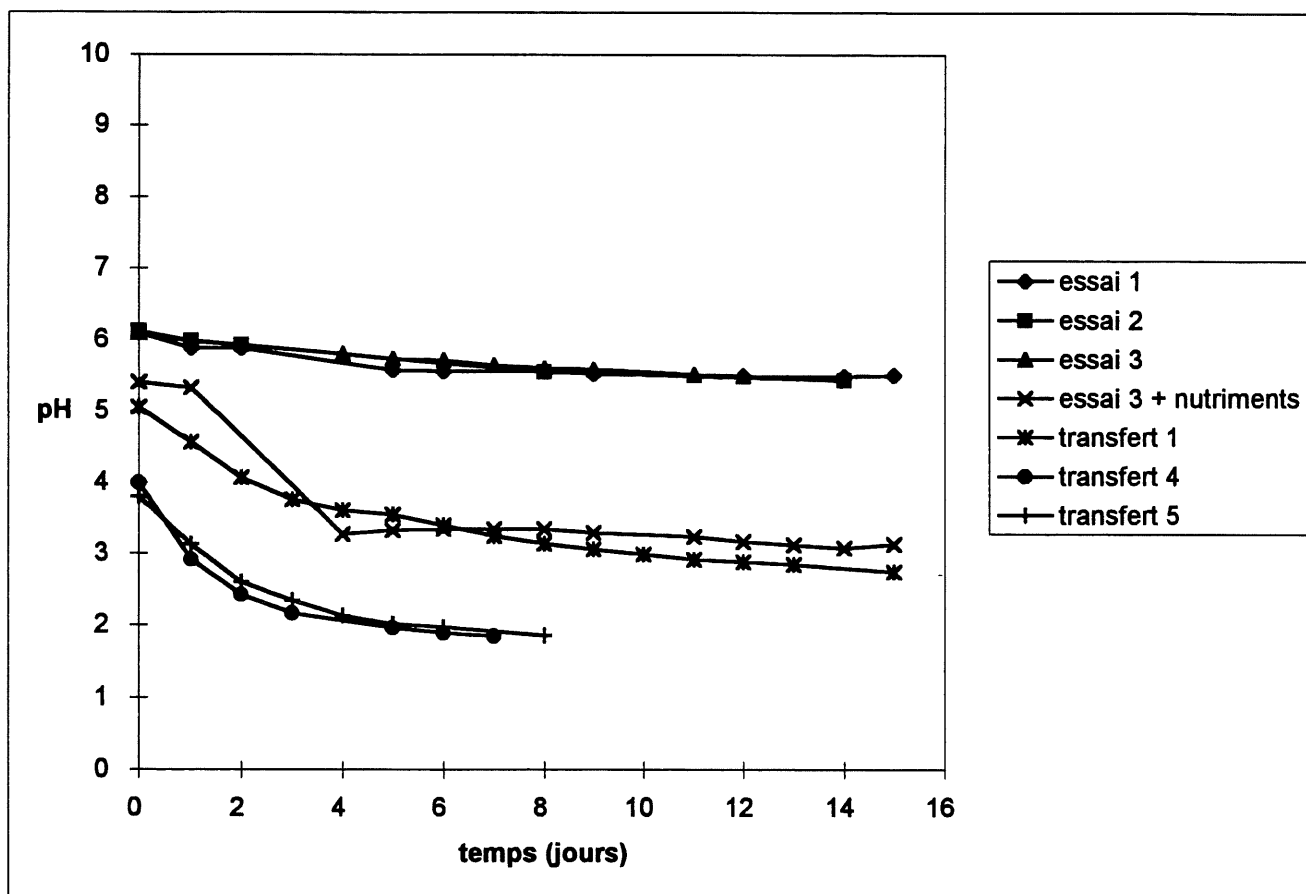


Figure 5.3: Evolution du pH pendant l'adaptation du sol de Eustis

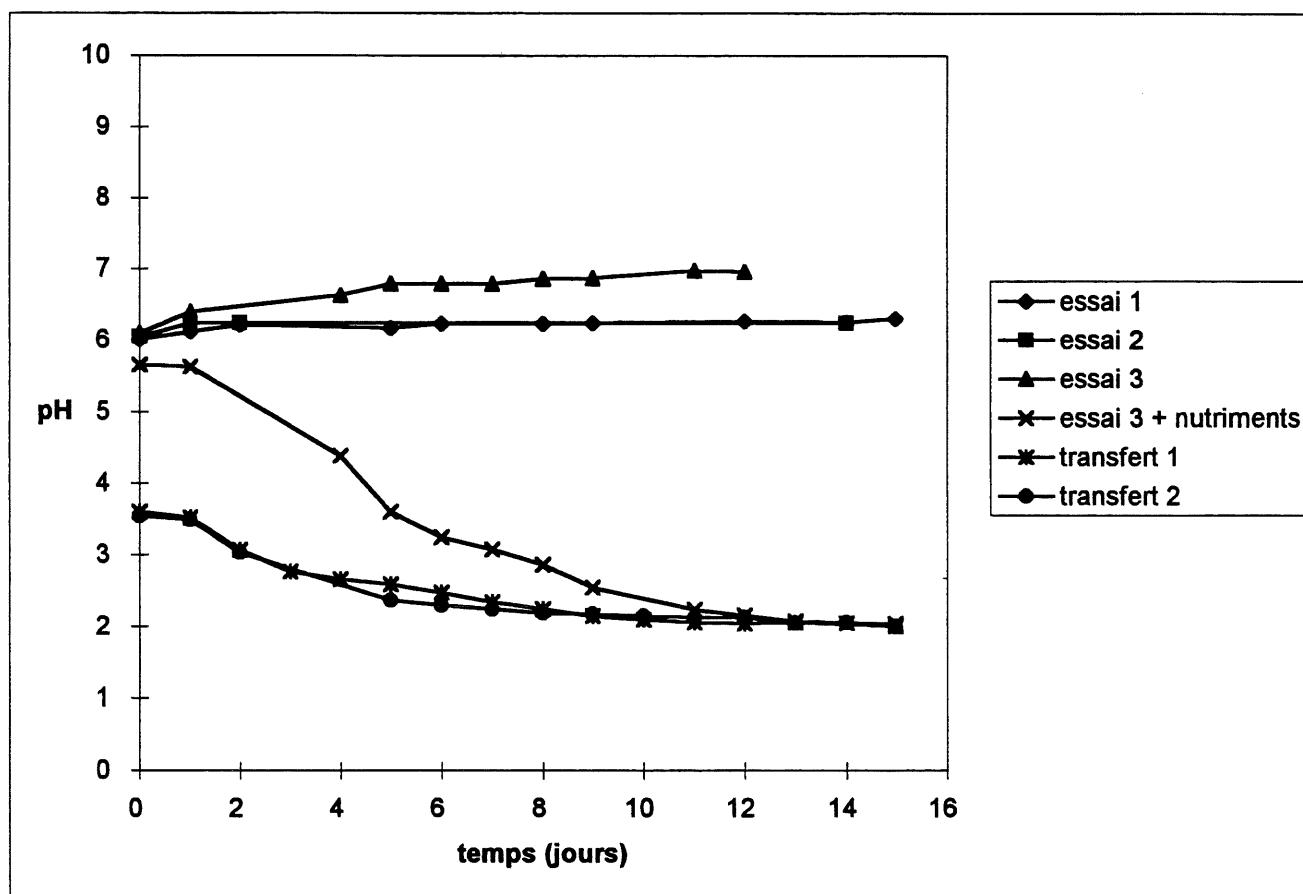


Figure 5.4: Evolution du pH pendant l'adaptation du sol de Sherbrooke

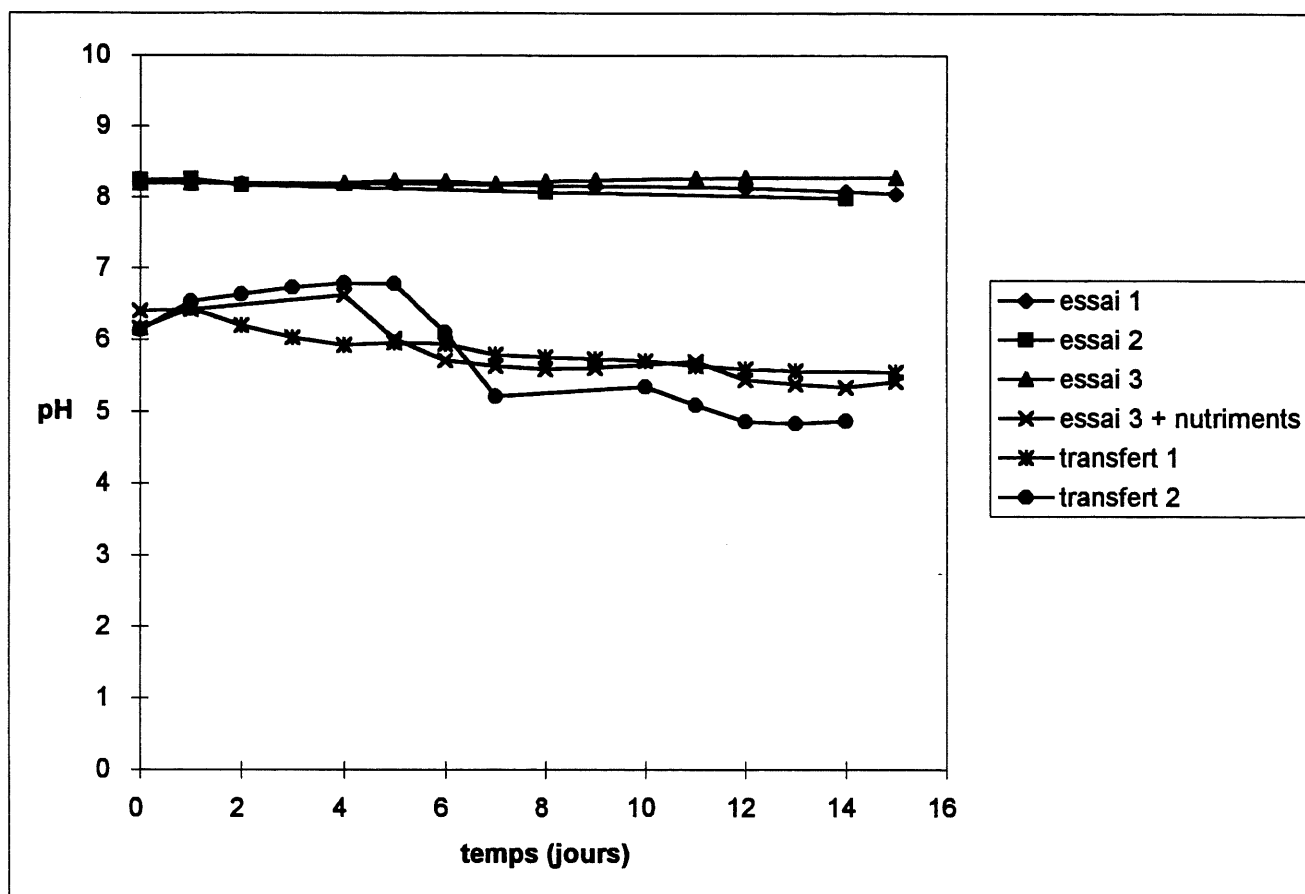


Figure 5.5: Evolution du pH pendant l'adaptation du sol de Montréal

plusieurs éléments pour la croissance de bactéries oxydant le soufre. Donc, après le deuxième essai, suite aux faibles chutes de pH obtenues, il a été décidé d'ajouter des nutriments au mélange de base afin de combler une carence en certains éléments, ce qui semblait inhiber la croissance de la microflore. Des nutriments sous forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de K_2HPO_4 , deux composants majeurs du milieu liquide synthétique 9K de Silverman et Lundgren [73], ont donc été incorporés aux mélanges lors du deuxième transfert aux concentrations utilisées par Zagury et al. [67] de 3,0 g/l et 0,5 g/l respectivement. Un contrôle témoin sans nutriments a aussi été effectué. Sur les figures 5.2 à 5.5, on peut comparer le troisième essai avec (essai 3 + nutriments) et sans (essai 3) nutriments pour les quatre sols. Sans nutriments, la chute de pH est similaire à celles des essais précédents. Par contre, avec des nutriments, on remarque, sauf pour le sol de Montréal, un pH initial légèrement inférieur dû à l'ajout des nutriments suivi d'une pente de la courbe de pH nettement accentuée. En effet, un pH de 2 est atteint après 9 jours pour le sol de Drummondville (figure 5.2) et 15 jours pour celui de Sherbrooke (figure 5.4). Le sol de Eustis (figure 5.3) atteint un pH de 3,3 en 4 jours puis se stabilise pendant quelques jours pour redescendre lentement par la suite. Quant au sol de Montréal (figure 5.5), on remarque une légère baisse de pH dont la pente est semblable avec ou sans nutriments, ce qui veut dire qu'il est probable que d'autres facteurs comme la capacité tampon ou la toxicité de certains métaux inhibent la croissance de la microflore, ce qui sera discuté plus loin.

Les résultats précédents semblent indiquer que les nutriments ajoutés sont essentiels à la croissance des bactéries oxydant le soufre et ne se trouvaient pas en quantité suffisante dans les sols expérimentés. Plus tard, certains essais ont démontré que seul l'ajout de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ était nécessaire, ce qui indique que les autres éléments devaient déjà se trouver en quantité suffisante dans les sols. L'ajout de K_2HPO_4 a donc été annulé après l'essai 3.

Par la suite, afin d'adapter les microflores, des transferts successifs ont été effectués. Ces transferts consistent en l'inoculation de 10% de sol acidifié à l'étape précédente à un mélange frais de sol, eau, soufre et nutriments aux mêmes concentrations que précédemment. Pour les sols de Drummondville et Sherbrooke (figures 5.2 et 5.4), un seul transfert sera nécessaire avant que leur microflores respectives soient considérées adaptées c'est à dire que la chute de pH soit maximisée donc que la différence de vitesse d'acidification soit négligeable entre deux transferts successifs. Pour le sol de Eustis (figure 5.3), quatre transferts seront nécessaire avant l'adaptation. Le sol de Montréal (figure 5.5) n'a pu être adapté, ce qui sera discuté plus loin.

Les travaux de Blais et al. [63] sur la biolixiviation des métaux dans les boues d'épuration ont permis de différencier deux types d'adaptation. Le premier type est une adaptation rapide, ne nécessitant qu'un seul transfert et la chute de pH lors de

l'acidification initiale se produit en une seule étape jusqu'à une valeur de 2 ou moins. Le deuxième type est plus lent et l'acidification initiale se produit en deux étapes soient une chute rapide du pH jusqu'à 4 ou 5 suivie d'un plateau puis d'une autre chute de pH jusqu'à une valeur inférieure à 2. Cette tendance (plateau) diminue et disparaît après quelques transferts. Ce type d'acidification serait dû à l'activité de deux catégories de bactéries oxydant le soufre soient les peu-acidophiles comme l'espèce T. thioparus qui sont responsables de la première chute de pH et les acidophiles comme la T. thiooxidans qui commencent à croître à partir d'une valeur de pH d'environ 4 à 5 [29,32,62,63].

Dans le cas des sols de Drummondville et Sherbrooke (figures 5.2 et 5.4), la chute de pH à une valeur de 2 s'est produite de façon similaire au premier type d'adaptation soit rapidement et en une seule étape, ce qui indique que des bactéries oxydant le soufre acidophiles et peu-acidophiles étaient présentes en grande quantité et actives du point de vue métabolique. Une autre espèce de bactérie comme la Thiobacillus intermedius, qui permet de réduire le pH d'un milieu synthétique de 7 jusqu'à 1,9 à 2,0 [29,63], peut aussi être responsable de la baisse de pH en une seule étape.

Dans le cas du sol de Eustis (figure 5.3), on ne peut pas tout à fait le classer dans le deuxième type car le plateau n'a pas été suivi d'une chute rapide. Cependant, il est possible que les bactéries peu-acidophiles aient été présentes en quantité importante et bien adaptées dans le sol d'ou la chute rapide de pH

jusqu'à 3,3 tandis que les bactéries acidophiles ne se trouvaient qu'en très faibles quantités. Ces dernières auraient ainsi pris plus de temps à s'adapter au milieu.

Enfin, avec le sol de Montréal (figure 5.5), il a été impossible d'obtenir une acidification suffisante pour permettre la biolixiviation. La plus grande baisse de pH a été obtenue au deuxième transfert soit une chute d'un pH initial de 6,1 à un pH de 4,8 en 11 jours suivie d'une stabilisation. Cette acidification semble indiquer la présence d'une faible activité bactérienne non acidophile. Cependant, par la suite, malgré plusieurs transferts et l'ajout de tous les autres nutriments recommandés par Pelczar et Reid [72], jamais la valeur de pH visée de 2 n'a été approchée. Plusieurs raisons peuvent expliquer cet échec. Il est possible que certains hétérotrophes soient entrés en compétition avec les thiobacilles pour l'utilisation de l'oxygène et aient ainsi inhibés leur croissance. Cependant, des tests effectués avec le sol de Montréal autoclavé et inoculé avec des microflores de Drummondville et Eustis n'ont pas montré de meilleurs résultats. De plus, les fortes concentrations de métaux toxiques dans le sol de Montréal (tableau 4.2) rendent improbable la prolifération de la plupart des hétérotrophes. Ces concentrations, particulièrement celles en Ni et en Cu, peuvent aussi avoir eu un effet inhibiteur sur la croissance des thiobacilles même si ces bactéries sont réputées pour pouvoir tolérer de très fortes concentrations de métaux. De plus, pour des raisons techniques, la concentration en certains métaux comme le mercure, l'argent ou l'arsenic n'ont pu être

déterminées. La toxicité de l'argent pour T. ferrooxidans est connue [45] et le mercure est réputé toxique pour plusieurs bactéries. Il est possible que la présence d'un ou plusieurs de ces métaux toxiques ait empêché l'adaptation de la microflore oxydant le soufre dans le sol de Montréal. Cependant, il est probable que ce soit l'effet tampon très important du sol de Montréal qui soit la cause de l'échec de la biolixiviation dans ce cas. En effet, un test de vérification a permis de constater qu'après 10 jours d'acidification, malgré l'absence de chute significative du pH, il y avait quand même production de sulfates.

La figure 5.6 montre une comparaison de la chute du pH en fonction du temps pour les sols de Drummondville, Eustis et Sherbrooke avant et après adaptation. L'addition de 1% de soufre élémentaire au mélange sol-eau en présence de nutriments permet d'abaisser le pH à une valeur de 2 en 9 jours pour le sol de Drummondville et 15 jours pour le sol de Sherbrooke. Le sol de Eustis n'a pas atteint cette valeur.

L'adaptation de la microflore oxydant le soufre par inoculations successives de 10 % de mélange acidifié a permis d'atteindre un pH de 2 en 4 jours pour le sol de Drummondville et 5 jours pour celui de Eustis. Ces résultats se comparent à ceux obtenus par Blais et al. [63] soient un pH de 2 en 1,5 à 7 jours selon les boues étudiées. Par contre, 12 jours ont été nécessaires pour atteindre un pH de 2 avec le sol de Sherbrooke.

Si l'on examine la composition de ce dernier sol, on remarque

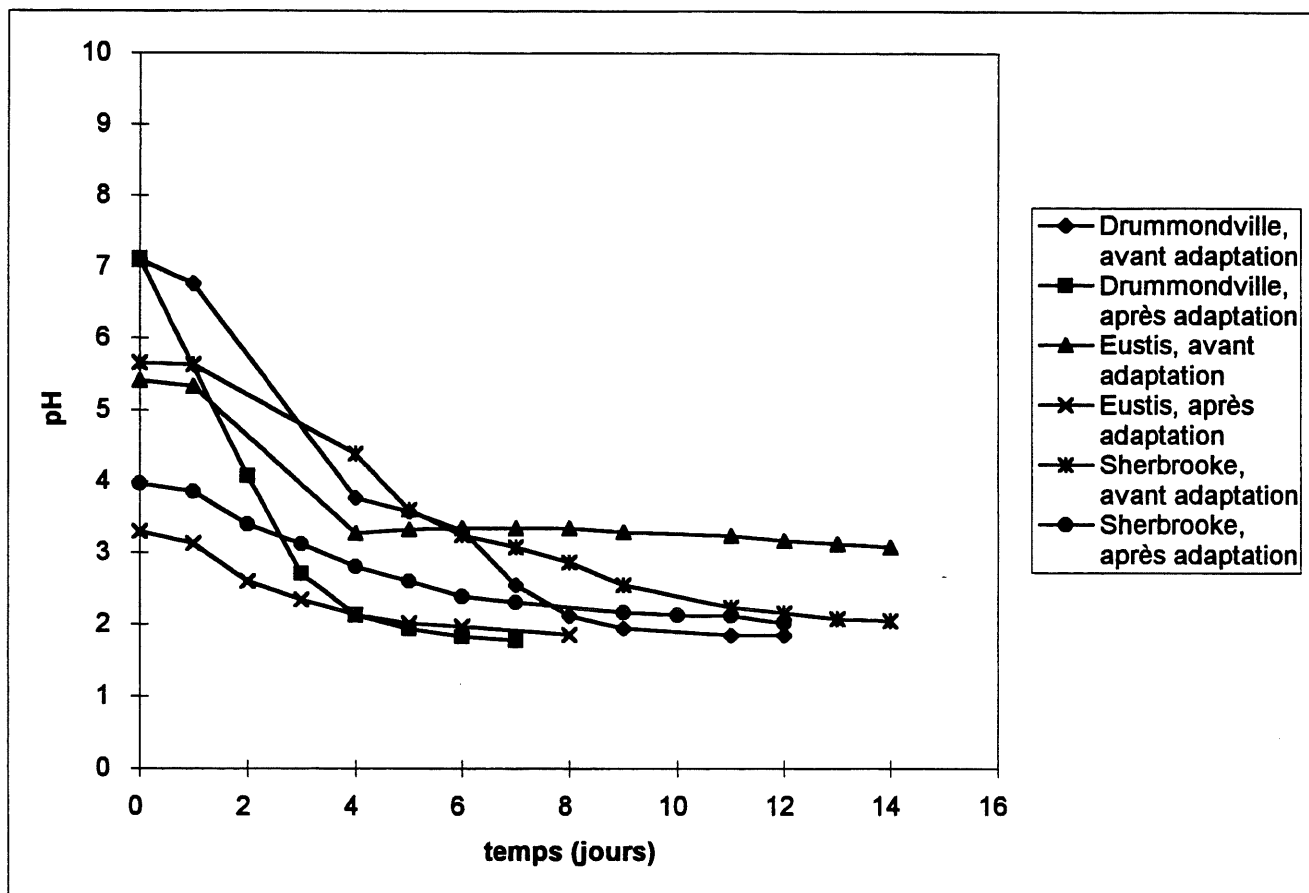


Figure 5.6: Comparaison de la chute de pH avant et après adaptation

qu'une caractéristique qui diffère de façon significative des autres sols est sa concentration en huiles et graisses (tableau 4.1). D'ailleurs, la concentration en huiles et graisses du sol de Sherbrooke (22655 ppm) dépasse largement la valeur du critère C (5000 ppm) du Ministère de l'environnement du Québec [3]. On sait que la présence d'une quantité importante d'huiles et graisses dans le sol peut mener à la formation d'un film à la surface du mélange et réduire le transfert des gaz [74-76]. Lors des essais avec le sol de Sherbrooke, la présence d'une couche d'huile a d'ailleurs été remarquée à la surface des Erlenmeyers. Or, le transfert d'oxygène et de dioxyde de carbone est un facteur déterminant pour la croissance des microorganismes aérobies [28] et par le fait même pour l'oxydation du soufre élémentaire en acide sulfurique. Il est donc possible que la présence de ce film soit responsable d'une légère inhibition de la croissance de la microflore oxydant le soufre du sol de Sherbrooke ainsi que d'une plus faible activité d'oxydation du soufre. De plus, les huiles et graisses peuvent être utilisées par certains hétérotrophes comme source de carbone et par le phénomène de la biodégradation, entrer en compétition avec les thiobacilles pour l'utilisation de l'oxygène [74-76]. Ces raisons pourraient expliquer pourquoi le sol de Sherbrooke nécessite un temps plus long d'acidification.

5.2 Résultats de la réactivation de la microflore

Tel qu'indiqué précédemment, l'expérience a dû être suspendue pendant une période de six mois durant laquelle les microflores adaptées ont été conservées, après inoculation dans du milieu frais, dans des Erlenmeyers fermés à l'aide de bouchons en mousse de polyuréthane à une température de 4°C. Etant donné l'impossibilité d'adapter la microflore du sol de Montréal pour la biolixiviation, ce dernier a été mis de côté pour la balance des expérimentations.

5.2.1 Survie des microflores adaptées

Afin de vérifier si les souches adaptées avaient survécu à la période de conservation, 10% de mélange adapté ont été inoculés à un mélange, stérilisé à l'autoclave, de sol, eau, soufre et nutriments. Le tout a été incubé dans les conditions habituelles. La figure 5.7 montre les résultats de l'acidification en fonction du temps pour les sols de Drummondville, Eustis et Sherbrooke. Comme on peut le remarquer, pour les trois sols, le pH est resté stable pendant quelques jours puis s'est mis à chuter rapidement par la suite. Il y a donc présence d'activité bactérienne et on peut conclure que les microorganismes oxydant le soufre adaptés peuvent survivre en Erlenmeyers à une période d'au moins six mois de conservation à 4°C.

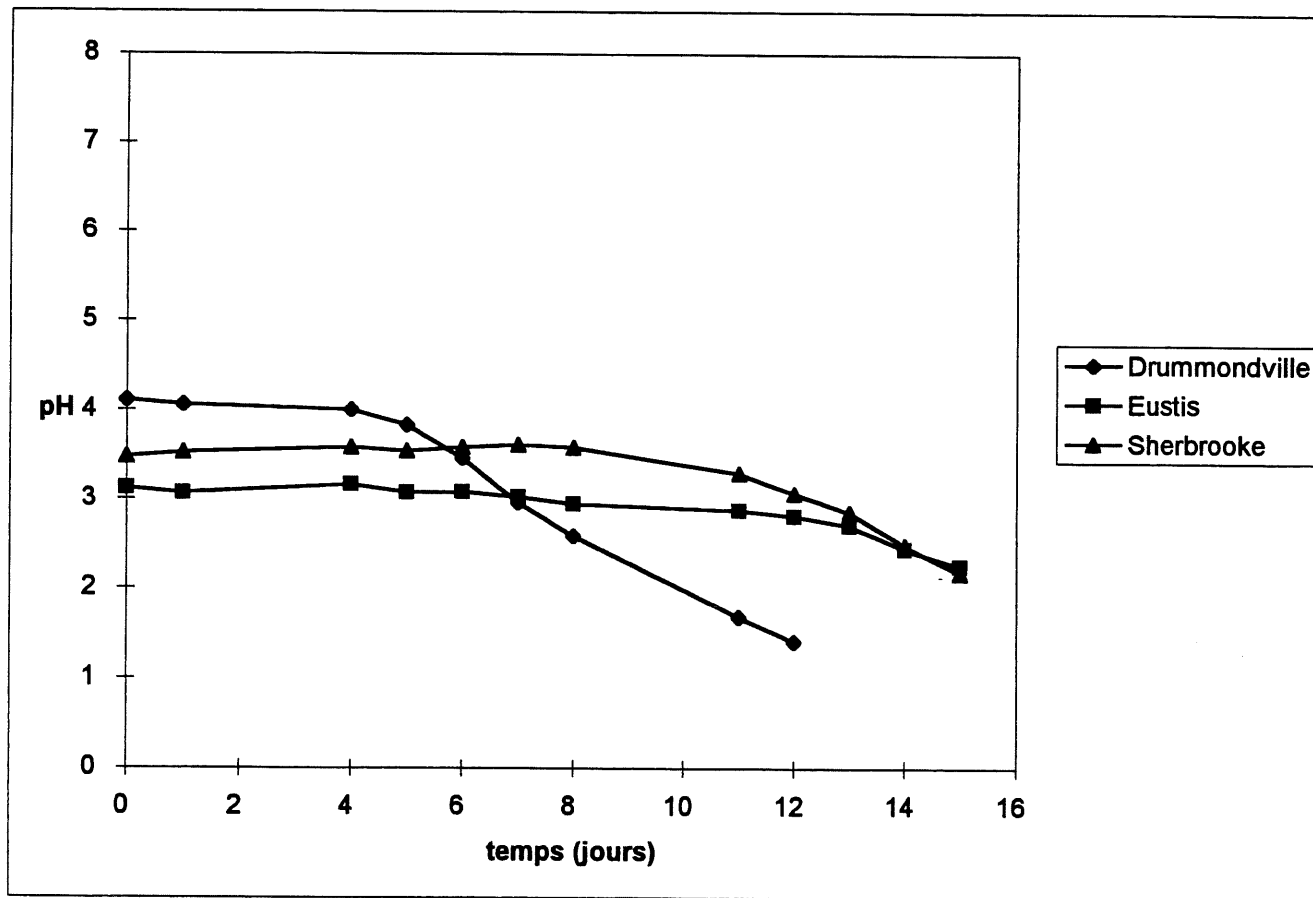


Figure 5.7: Vérification de la survie des microflores après 6 mois de conservation à 4°C

5.2.2 Réactivation

Les figures 5.8 à 5.16 montrent les résultats de la réactivation des bactéries oxydant le soufre pour chacun des sols et chacune des concentrations. Afin de réactiver les microflore, plusieurs transferts ont été effectués comme pour l'adaptation. Le premier mélange ou transfert initial dans chacun des cas consistait en un milieu frais à la concentration de solides voulue auquel on avait inoculé des bactéries adaptées conservées à 4°C. Les microflore étaient considérées réactivées lorsque la chute de pH était maximisée entre deux transferts successifs.

Pour le sol de Drummondville (figures 5.8 à 5.10), le processus de réactivation a été semblable à celui de l'adaptation initiale puisqu'un à deux transferts supplémentaires après le transfert initial ont été requis afin d'adapter la microflore oxydant le soufre aux trois concentrations.

Dans le cas du sol de Eustis (figures 5.11 à 5.13), 3 transferts supplémentaires ont été nécessaires afin de réactiver les bactéries pour la concentration de 15 g/l et 2 transferts pour les mélanges à 35 et 55 g/l de sol.

Enfin pour le sol de Sherbrooke (figures 5.14 à 5.16), les résultats ont été variables. A 15 g/l (figure 5.14), la microflore était réactivée dès le transfert initial. Cependant, pour des raisons inconnues, la chute de pH a été de beaucoup ralentie au deuxième transfert supplémentaire pour ensuite reprendre sa vitesse

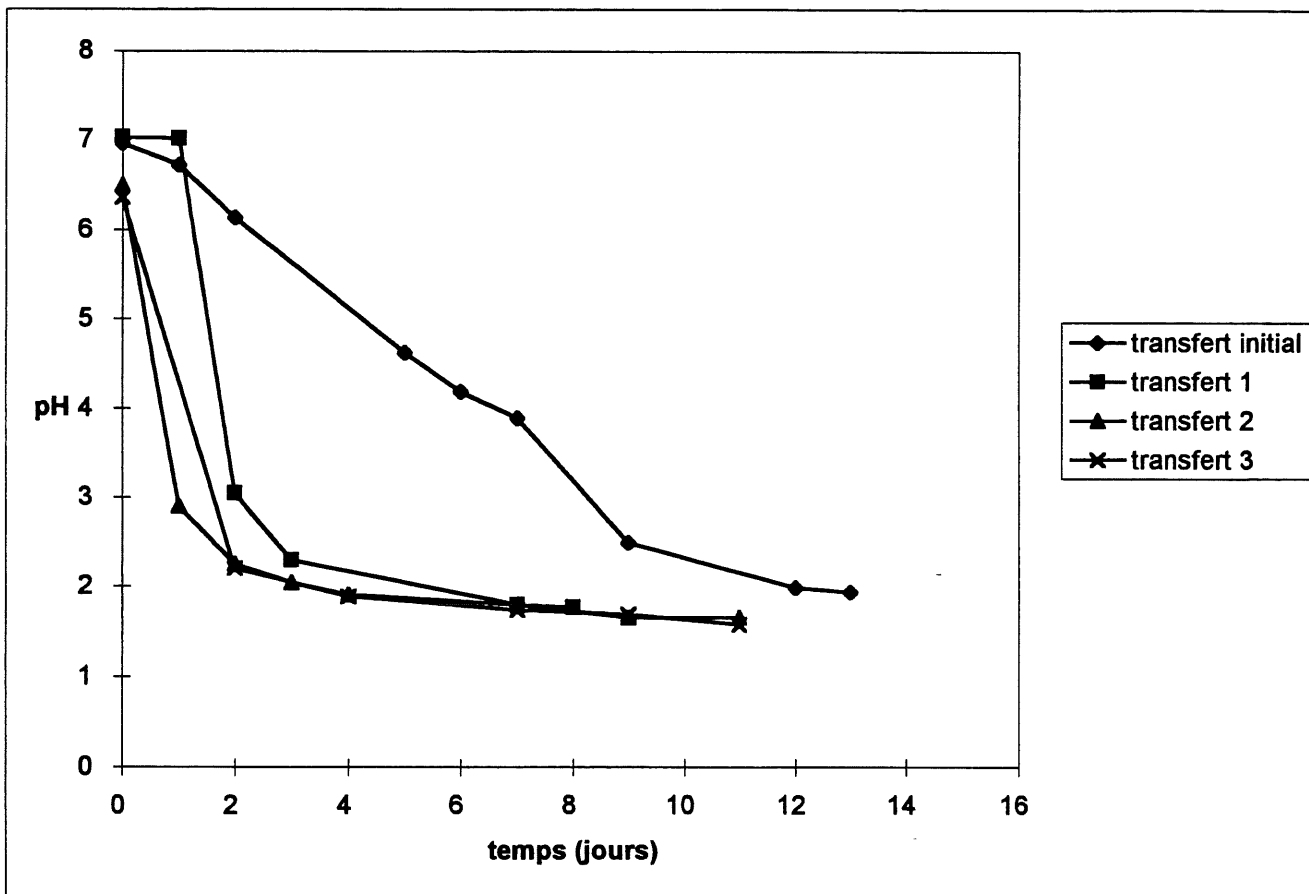


Figure 5.8: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Drummondville à 15g/l

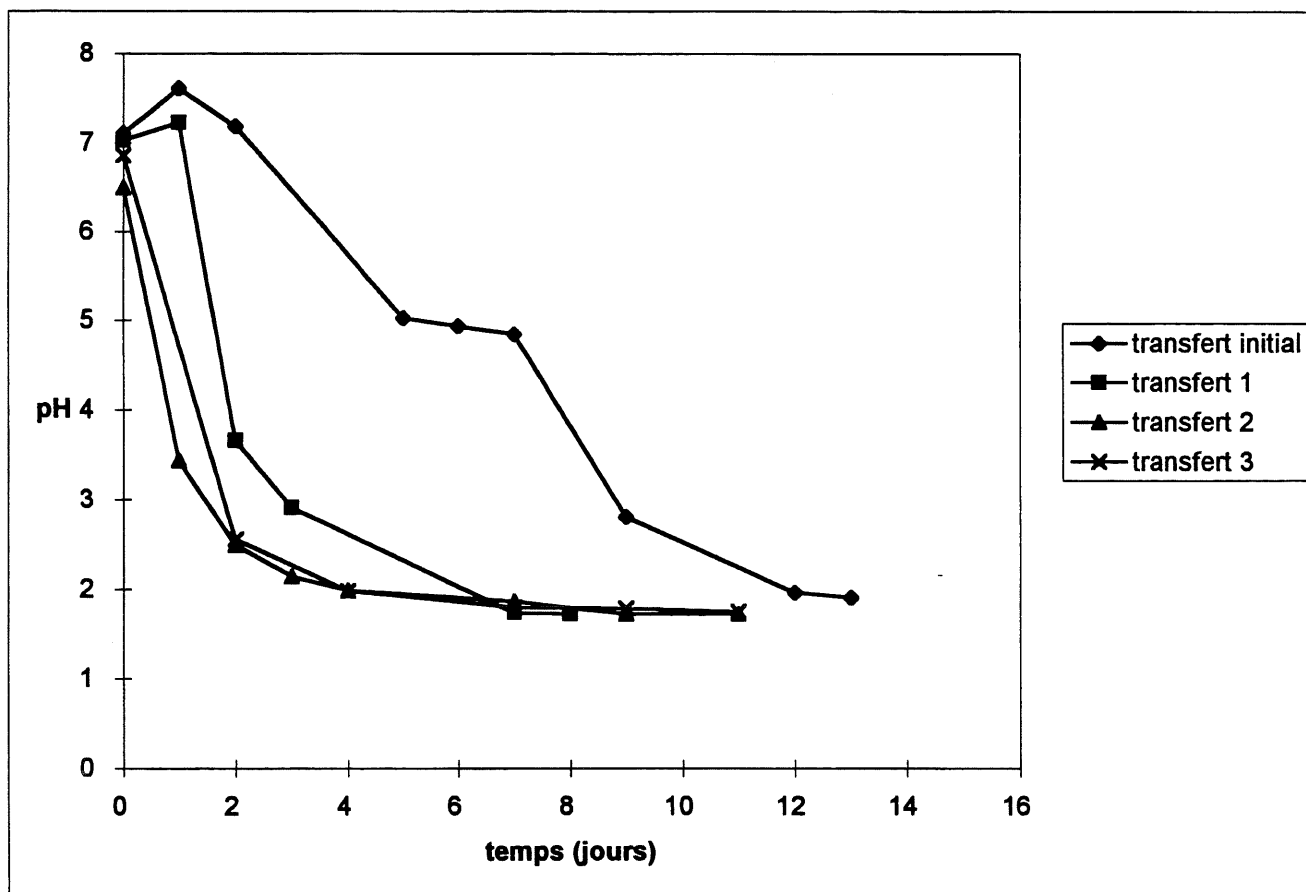


Figure 5.9: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Drummondville à 35g/l

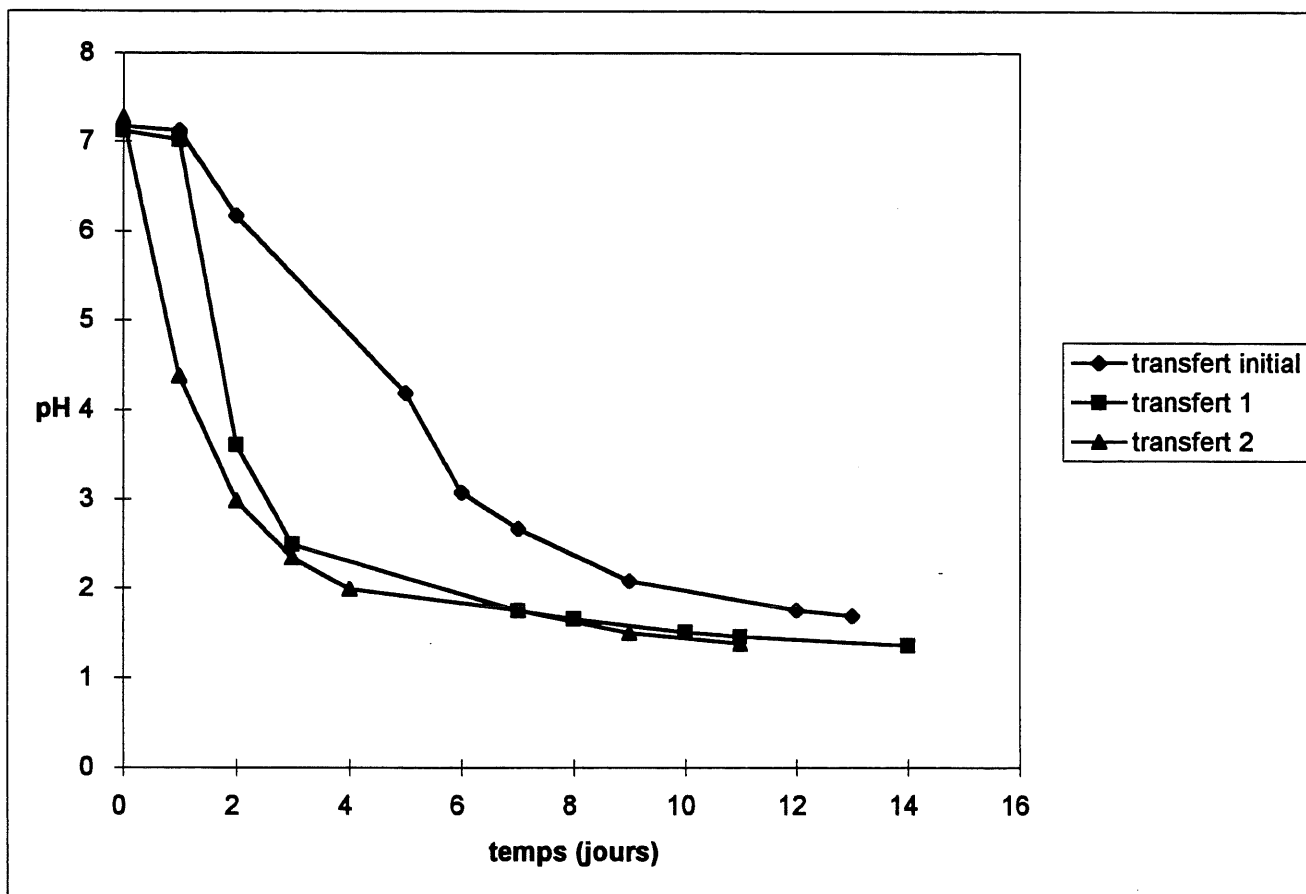


Figure 5.10: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Drummondville à 55g/l

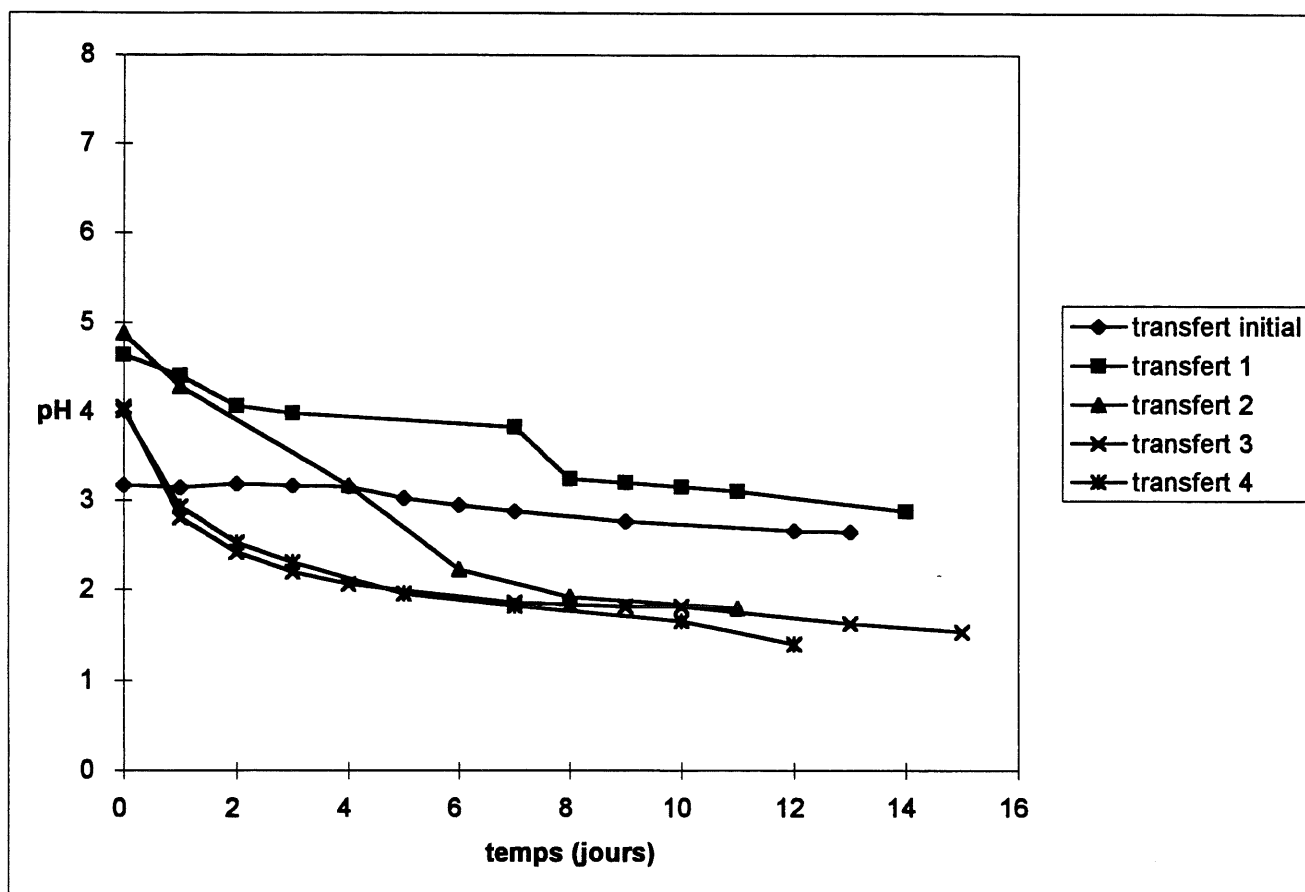


Figure 5.11: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Eustis à 15g/l

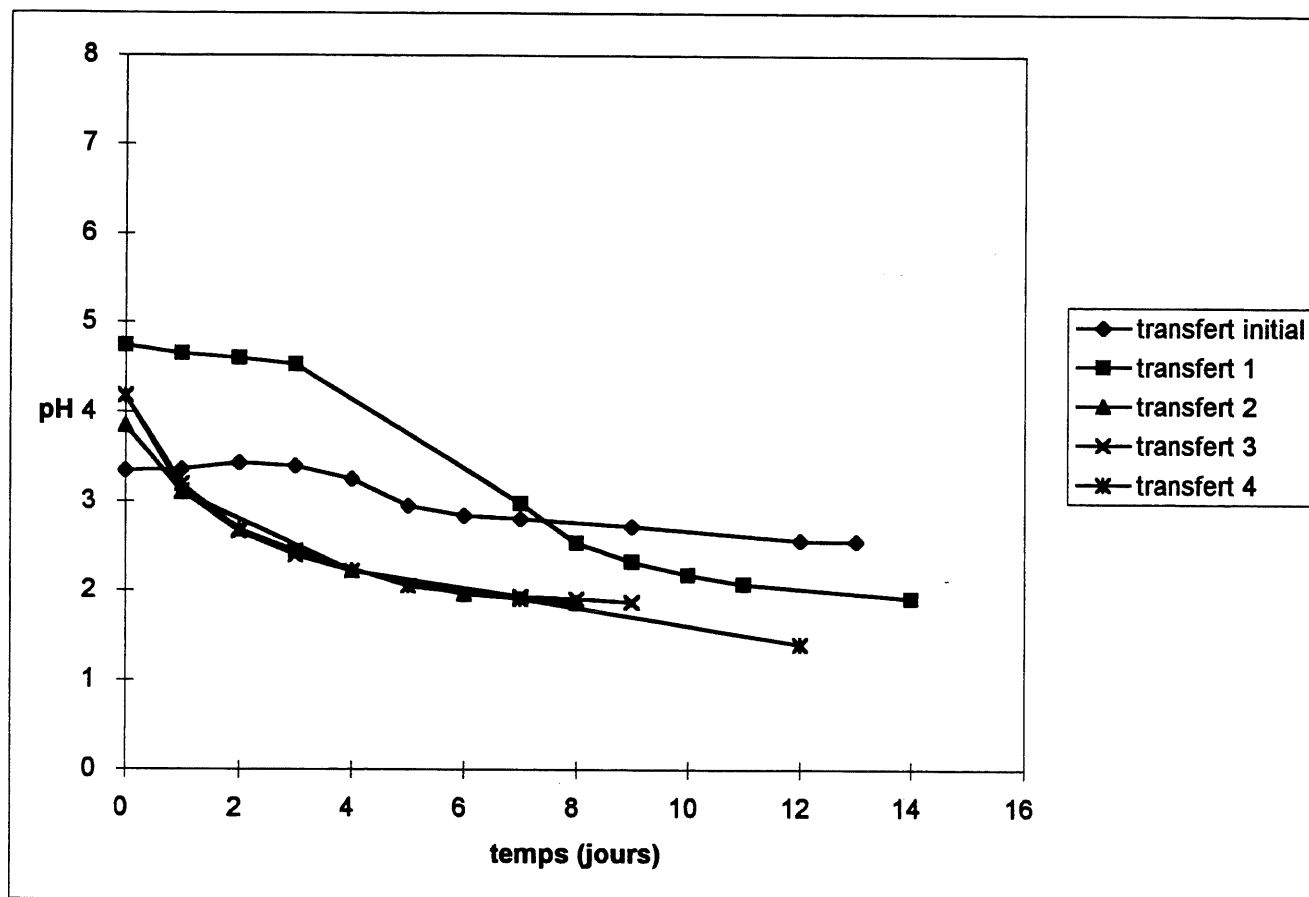


Figure 5.12: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Eustis à 35g/l

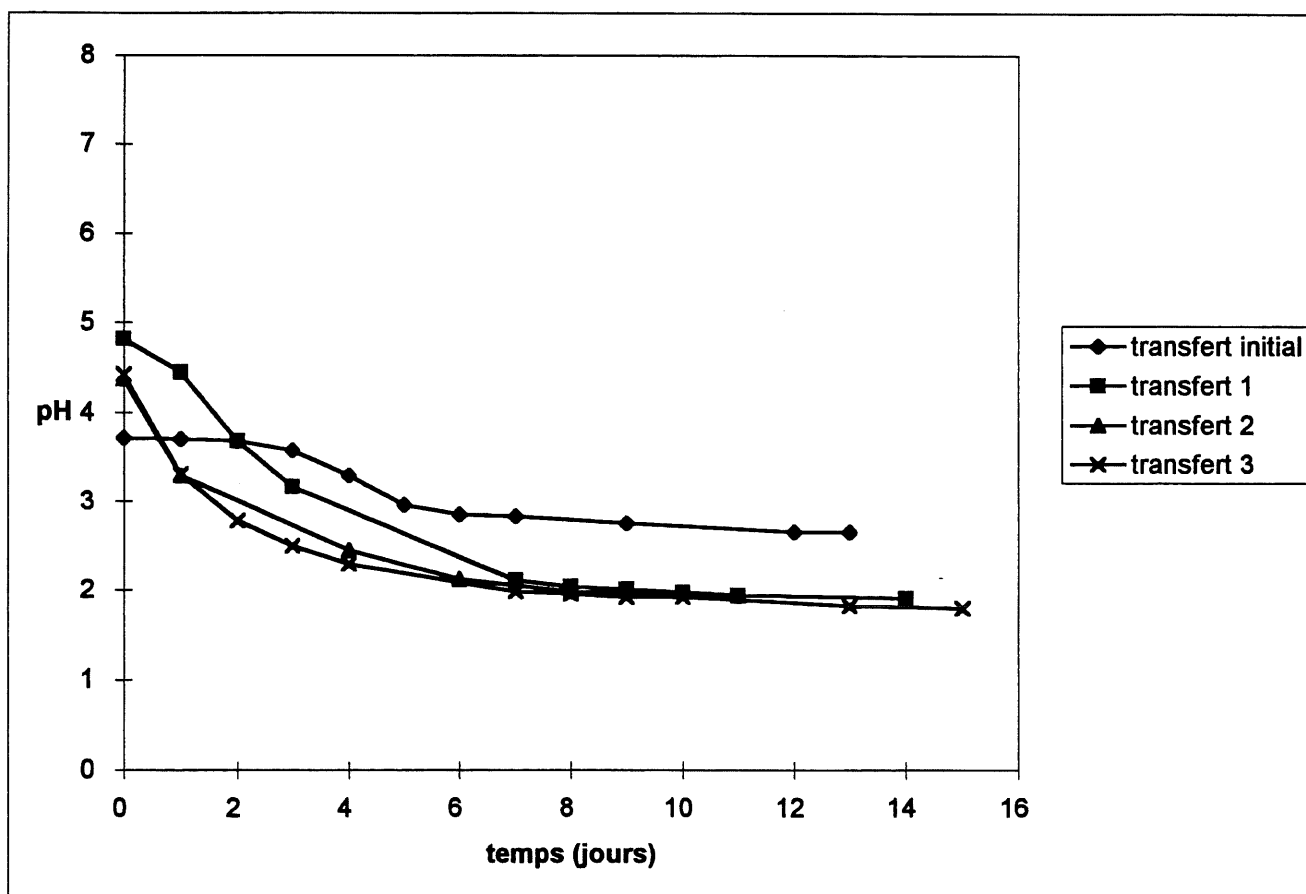


Figure 5.13: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Eustis à 55g/l

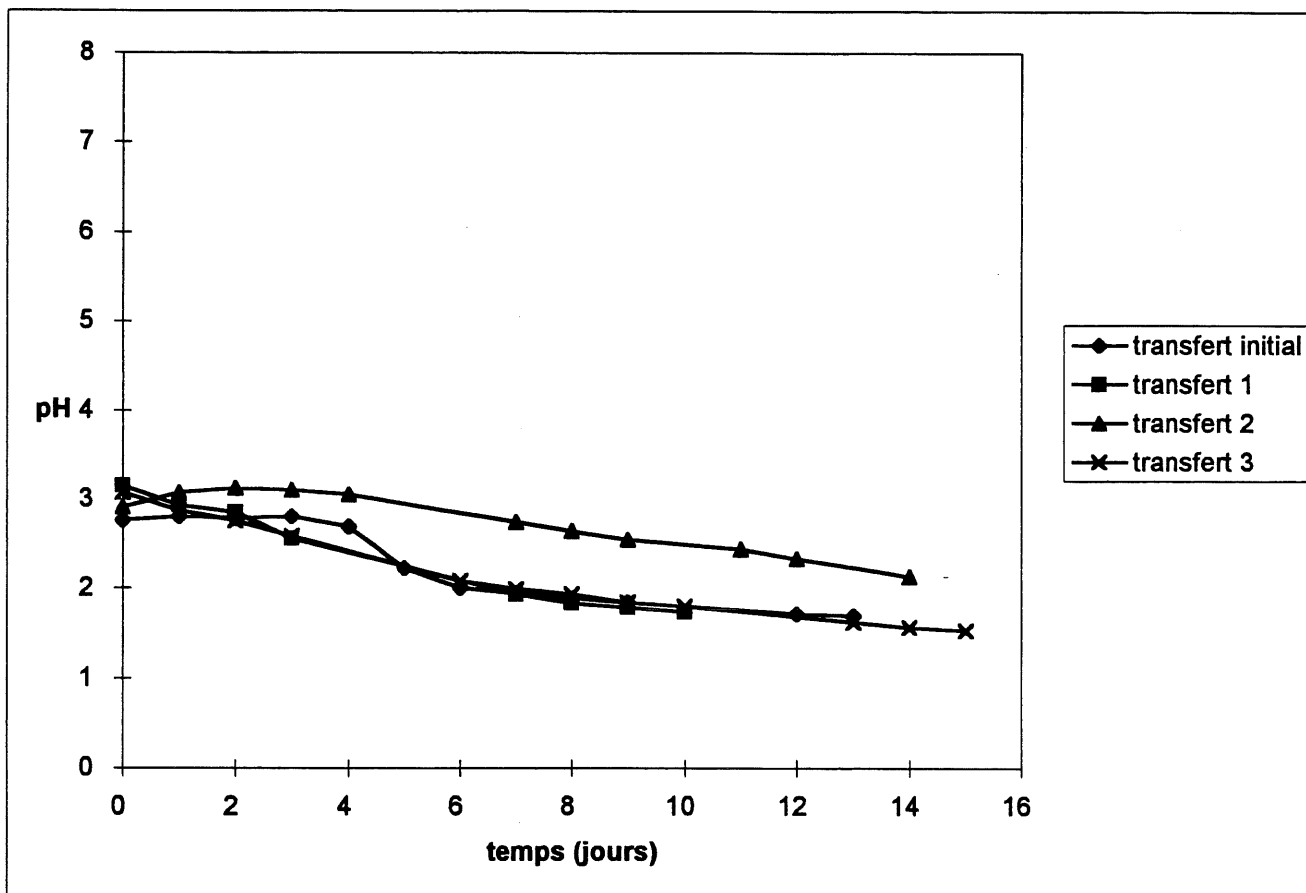


Figure 5.14: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Sherbrooke à 15g/l

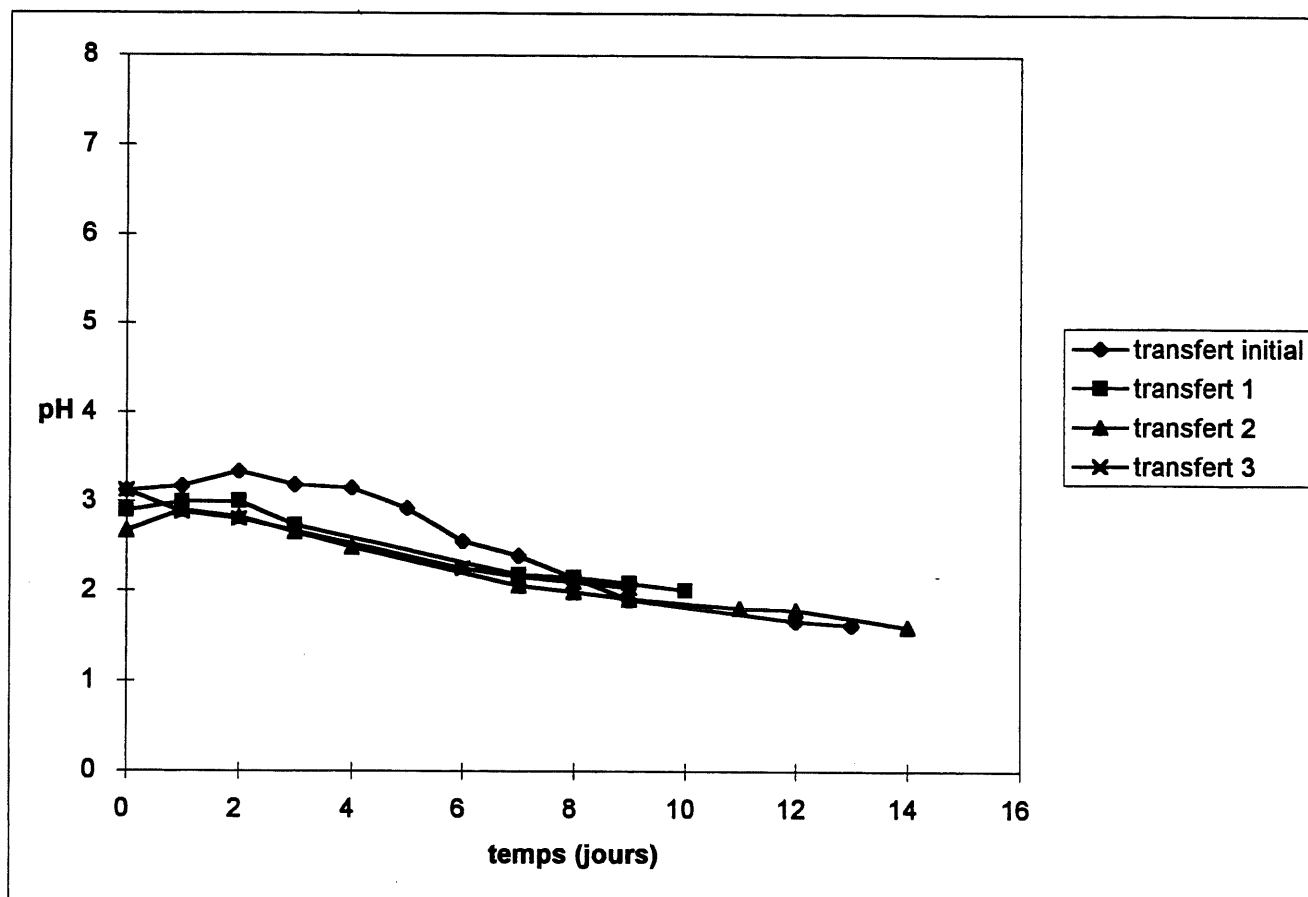


Figure 5.15: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Sherbrooke à 35g/l

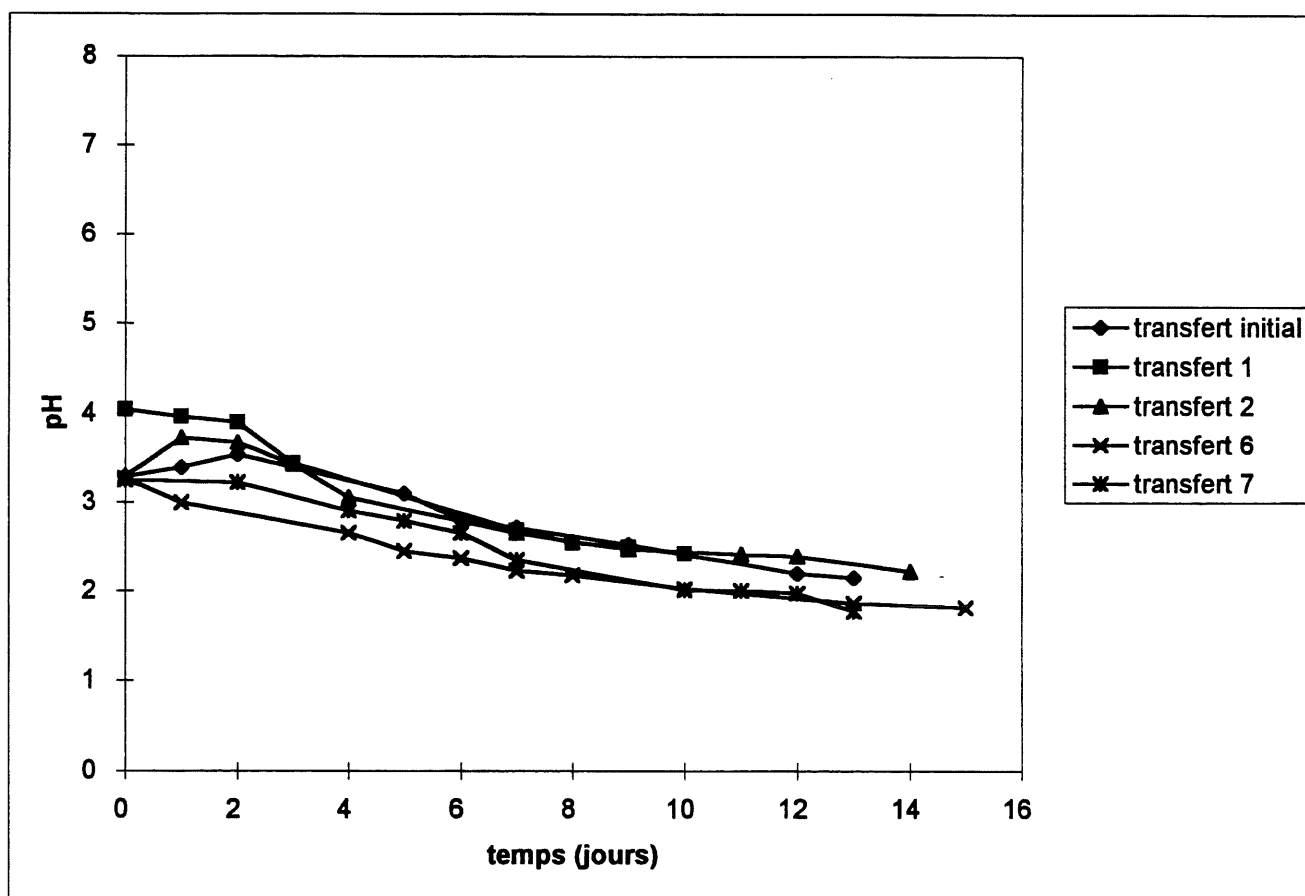


Figure 5.16: Evolution du pH pendant la réactivation du sol de Sherbrooke à 55g/l

maximale au transfert suivant. A 35 g/l (figure 5.15), un seul transfert supplémentaire a été requis afin de réactiver la microflore. Enfin, à 55 g/l (figure 5.16), la réactivation s'est effectuée de façon très lente et ne s'est vraiment stabilisée que vers le sixième transfert supplémentaire.

On peut aussi remarquer sur les figures 5.8 à 5.16 que comparativement à l'adaptation initiale, le pH minimum atteint après réactivation est plus bas. Ainsi, pour les sol de Drummondville, Eustis et Sherbrooke respectivement, le pH minimum atteint avec des microflores réactivées (15 g/l) a été de 0,9; 1,1 et 1,2 comparativement à 1,7; 1,8 et 2,0 avec les microflores adaptées initialement. Etant donné que les conditions expérimentales et les procédures de l'adaptation initiale sont demeurées inchangées pour la réactivation, on doit chercher ailleurs l'explication de cette augmentation de l'efficacité. Il est possible qu'une sélection naturelle se soit produite lors de la conservation à 4°C pendant 6 mois. Ainsi, les bactéries les plus résistantes auraient survécues. Il est aussi possible que les bactéries présentes dans le mélange se soient adaptées progressivement à survivre dans un milieu plus acide puisque le milieu de conservation était déjà acide et que l'activité bactérienne, bien que réduite, n'était pas complètement arrêtée. Le pH ayant continué de descendre progressivement, les bactéries les plus résistantes se seraient habituées à supporter des conditions de pH plus bas.

La vitesse d'acidification a aussi augmenté par rapport à

l'adaptation initiale. Ainsi pour le sol de Drummondville (figure 5.8), 3 jours au lieu de 4 ont été requis pour atteindre un pH de 2 et pour le sol de Eustis (figure 5.11), 4 jours au lieu de 5. Cependant, c'est le sol de Sherbrooke (figure 5.14) qui a le plus amélioré son efficacité en atteignant un pH de 2 en 7 jours au lieu de 12. Il est possible que les bactéries se soient adaptées à un milieu avec une forte concentration en huiles et graisses. Néanmoins, l'importance de cette caractéristique chimique des sols est considérablement réduite et bien que non sans influence, la concentration en huiles et graisses n'empêche pas l'utilisation de la technologie de biolixiviation.

5.3 Effets de la concentration de sol de l'inoculum

Les figures 5.17 à 5.19 montrent les résultats de l'expérience menée en parallèle afin de vérifier si la concentration de sol utilisée lors de l'adaptation d'une microflore oxydant le soufre avait une importance quelconque sur l'acidification lorsque cette microflore était inoculée à un sol frais .

On remarque que pour le sol de Drummondville (figure 5.17), le mélange à 55 g/l inoculé avec la microflore adaptée à 15 g/l montre une acidification initiale plus faible que celui à 55 g/l inoculé avec la microflore adaptée à 55 g/l. Ainsi après 24 heures, le premier a atteint un pH de 6,90 tandis que le pH du

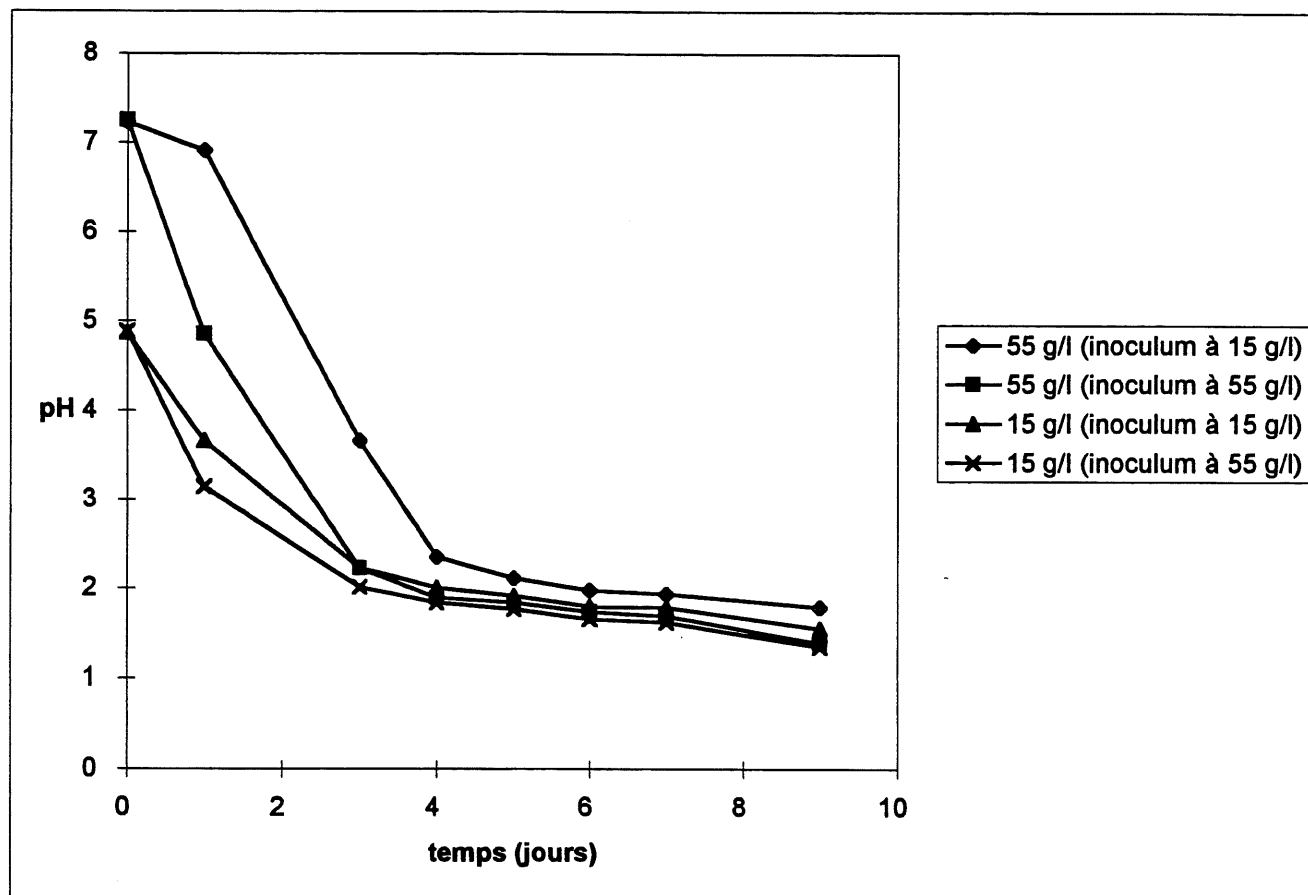


Figure 5.17: Effets sur l'acidification du sol de Drummondville de la concentration de solide à laquelle l'inoculum a été préparé

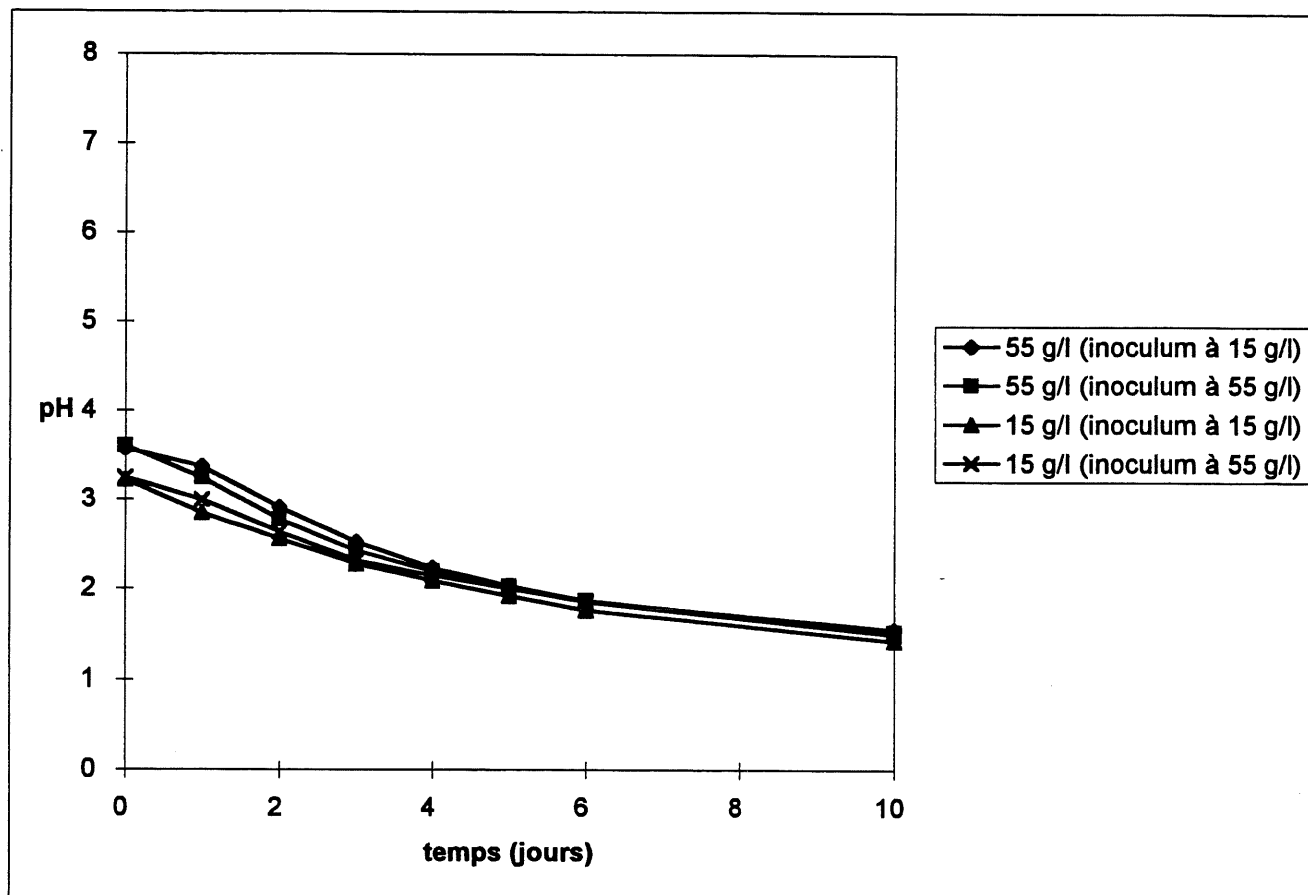


Figure 5.18: Effet sur l'acidification du sol de Eustis de la concentration de solide à laquelle l'inoculum a été préparé

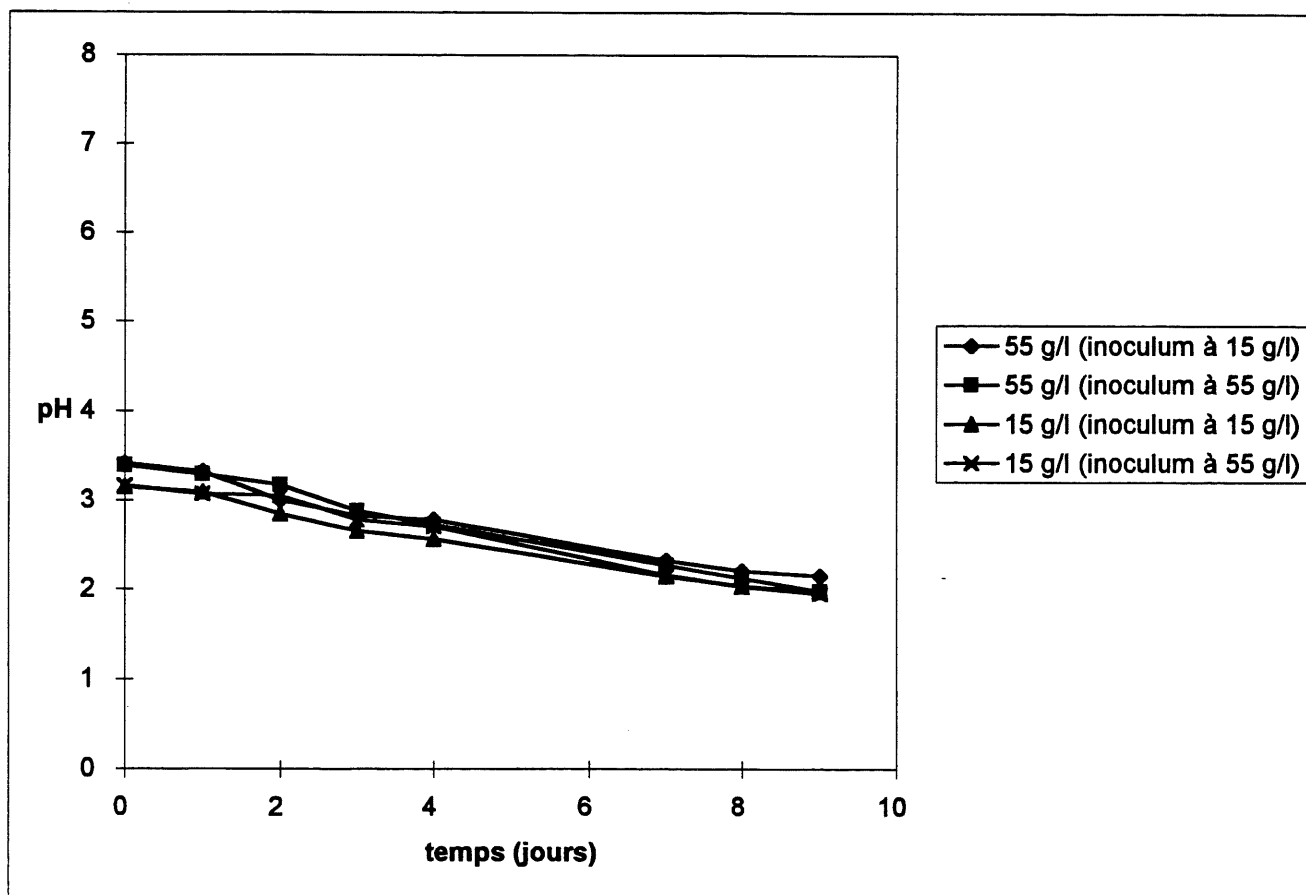


Figure 5.19: Effet sur l'acidification du sol de Sherbrooke de la concentration de solide à laquelle l'inoculum a été préparé

second est déjà abaissé à une valeur de 4,85. Par la suite, la différence s'atténue et les pentes d'acidification deviennent semblables. On remarque le même phénomène, bien que moins accentué, dans le cas des mélanges à 15 g/l de sol. Ainsi celui inoculé avec une microflore adaptée à 55 g/l démarre plus rapidement que celui dont les microorganismes ont été adaptés à une concentration de sol de 15 g/l.

Pour ce qui est du sol de Eustis (figure 5.18), on remarque les mêmes caractéristiques d'acidification mais de façon un peu moins accentuée. Par contre, si l'on regarde les résultats du sol de Sherbrooke (figure 5.19), on remarque que la concentration d'adaptation de la microflore n'influence pas le processus d'acidification.

On peut expliquer le phénomène remarqué chez les sols de Drummondville et Sherbrooke de la façon suivante. Une concentration plus élevée de sol implique une plus grande quantité disponible d'éléments nutritifs et de métaux trace essentiels à la croissance de la microflore oxydant le soufre. Donc, lors de l'adaptation des microflore à des concentrations plus élevées de sol, il est fort probable que la concentration des bactéries dans les Erlenmeyers était plus forte que dans le cas de l'adaptation à des concentrations plus faibles de sol. Ainsi, lors de l'inoculation des mélanges, une plus grande quantité de bactéries ont été transférées à partir des inoculums concentrés et l'acidification a pu démarrer de façon plus rapide.

Dans le cas du sol de Sherbrooke, il est possible que les éléments trace essentiels soient en concentration tellement élevée que le facteur limitant de la croissance soit autre que les nutriments (par exemple le pH). Ainsi, dans ce cas, la concentration de sol n'aurait aucune influence sur la quantité de bactéries inoculées lors d'un transfert.

En raison de ces résultats, il fut décidé que pour les essais de biolixiviation, l'inoculum utilisé serait adapté à une seule concentration soit 55 g/l afin de maximiser les résultats. De plus, l'utilisation d'un seul inoculum permet de comparer plus facilement les effets de différentes concentrations de sol au niveau du processus d'acidification et de l'efficacité de lessivage des métaux.

5.4 Contrôles témoins

Durant l'adaptation et la réactivation, plusieurs essais témoins tels que décrits dans la partie expérimentation ont dû être effectués afin de vérifier la cause de l'acidification.

La figure 5.20 montre les résultats des témoins contenant eau et soufre ainsi que eau, soufre et nutriments. Comme on peut le constater, dans les deux cas, aucune réduction du pH n'a été enregistrée. Donc, on peut conclure qu'une baisse de pH durant les expérimentations ne peut être reliée à une oxydation du soufre par l'air.

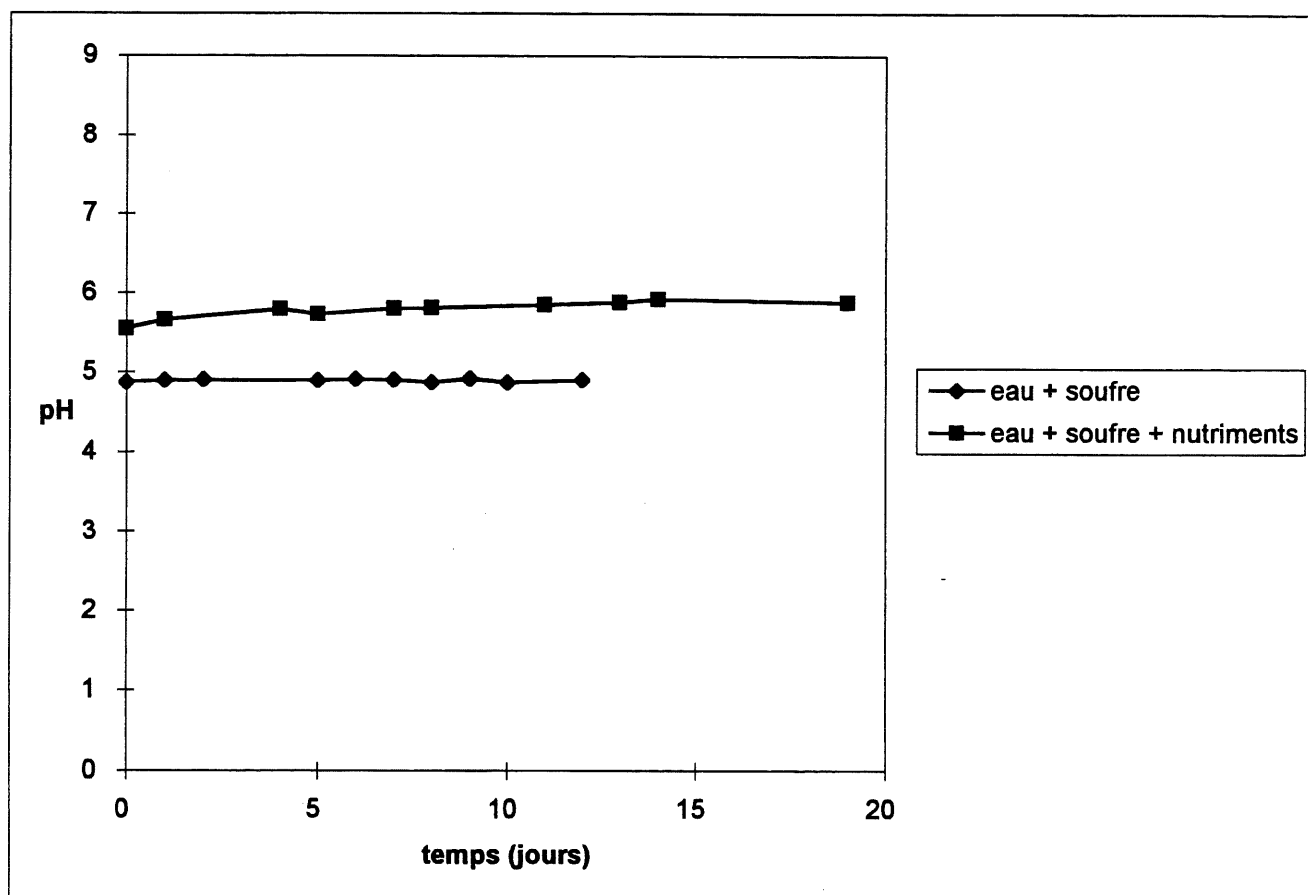


Figure 5.20: Contrôles témoins indépendants des sols

Les figures 5.21 à 5.23 montrent les résultats pour les sols de Drummondville, Eustis et Sherbrooke respectivement des autres types de contrôles témoins.

Avec les témoins contenant sol et eau, on remarque que pour les trois sols étudiés, aucune acidification ne se produit. L'importance de l'oxydation du soufre dans le processus d'acidification est donc confirmée. Ces résultats nous permettent aussi de constater l'absence de soufre dans les trois sols.

Les contrôles témoins contenant un mélange, stérilisé à l'autoclave, de sol, eau, nutriments et soufre ne montrent aucune variation du pH si ce n'est une légère augmentation. On peut donc conclure que l'acidification des mélanges est de source microbiologique et qu'aucune oxydation chimique n'entre en cause dans le processus.

Enfin, sur les mêmes figures, on peut voir les résultats du dernier type de témoin utilisé soit un mélange de sol, d'eau et de nutriments inoculés avec les microflores adaptées mais sans ajout de soufre. Encore une fois, pour les trois sols étudiés, on ne remarque aucune réduction du pH. Ces résultats sont très importants car il permettent de conclure que l'acidification des mélanges est due uniquement à l'oxydation du soufre élémentaire par des microorganismes oxydant le soufre indigènes. En effet, une quelconque réduction du pH dans ces conditions aurait permis de croire qu'un autre type d'oxydation, notamment celle du fer ionique

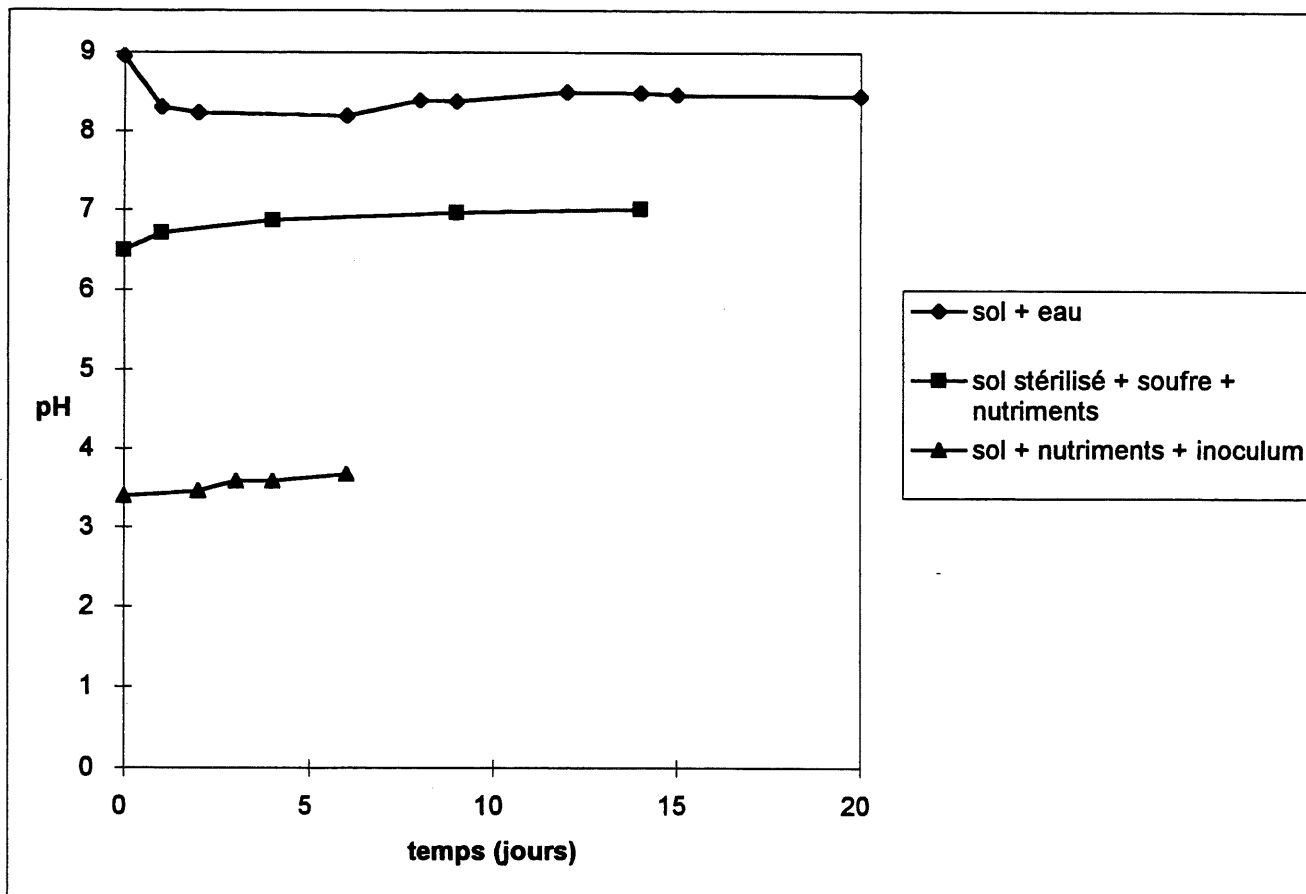


Figure 5.21: Contrôles témoins pour le sol de Drummondville

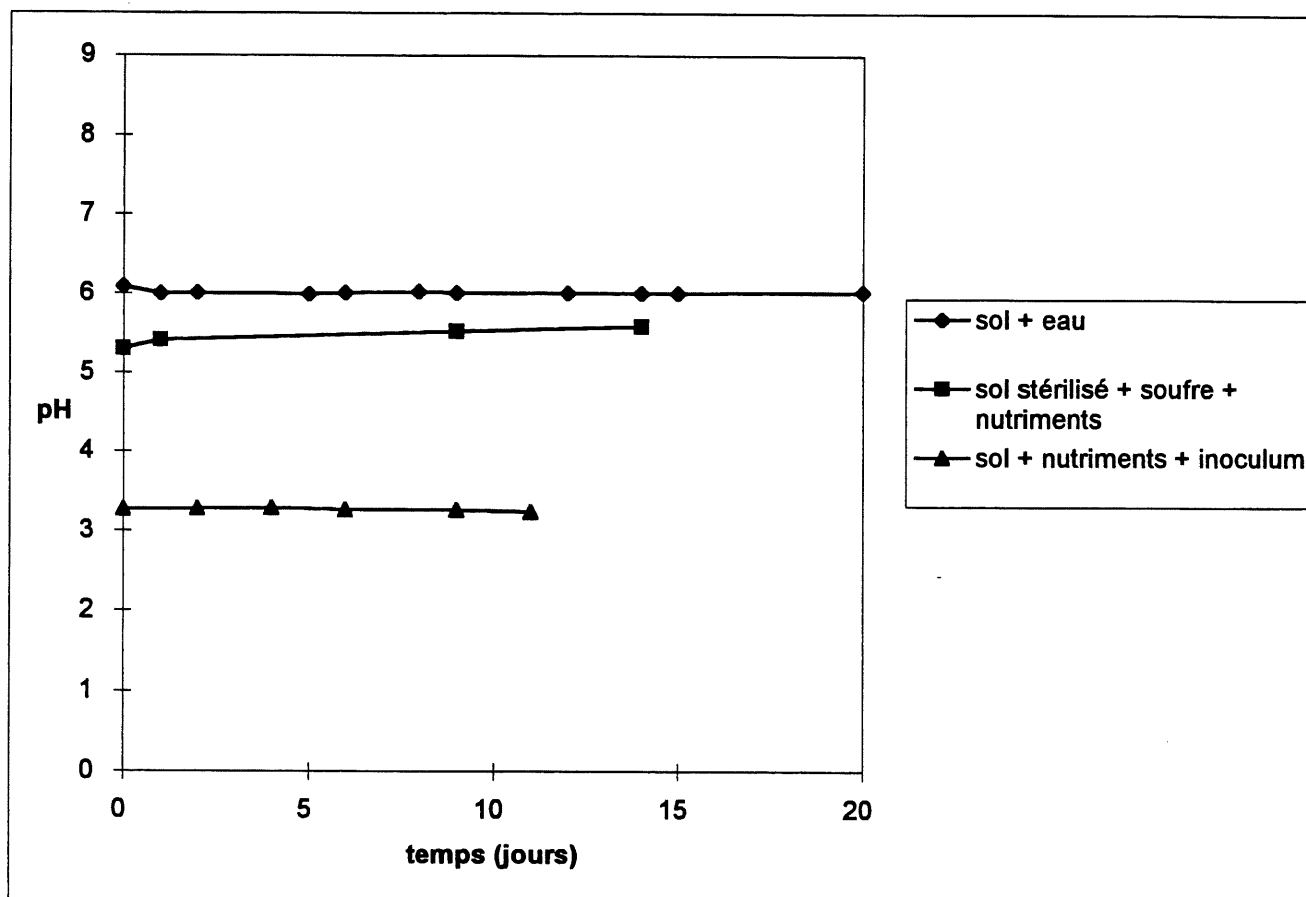


Figure 5.22: Contrôles témoins pour le sol de Eustis

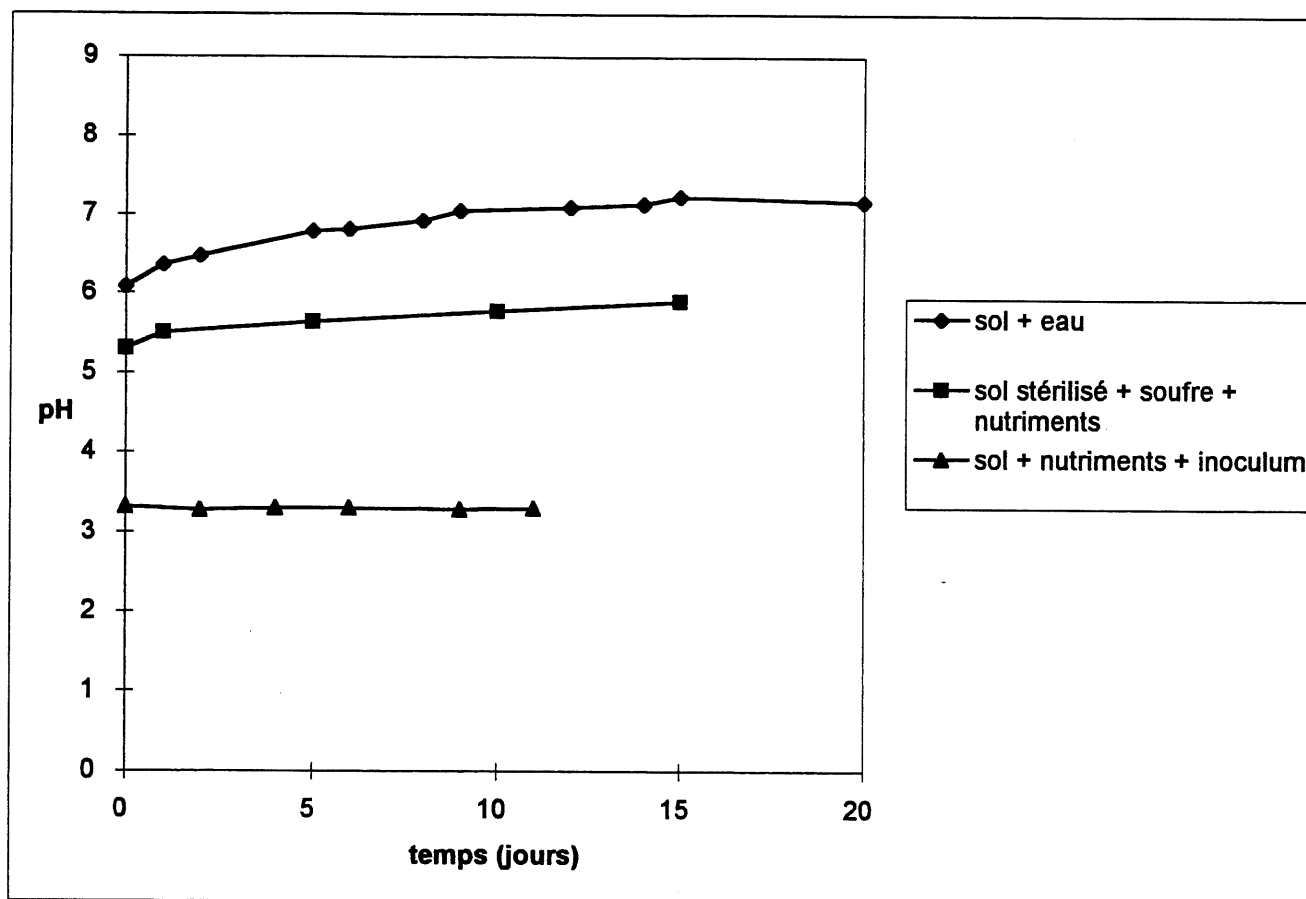


Figure 5.23: Contrôles témoins pour le sol de Sherbrooke

par les bactéries comme T. ferrooxidans, était impliqué dans l'expérimentation et que la source d'énergie de ces microorganismes adaptés en parallèle lors des transferts successifs était présente en quantité suffisante dans les sols. Comme il n'y a eu aucune acidification, on peut conclure que seuls les microorganismes oxydant le soufre ont été adaptés et que le seul substrat oxydé est le soufre élémentaire.

5.5 Biolixiviation

5.5.1 Variation du pH

Le tableau 5.1 présente le pH initial et final, la quantité de sulfates initiale et finale ainsi que le pourcentage de soufre oxydé pour les trois sols et à chacune des concentrations étudiées. De plus, les figures 5.24 à 5.26 montrent la variation du pH en fonction du temps pour les trois sols respectivement. Sur ces figures sont présentés les résultats des trois concentrations, a et b étant des duplicatas tandis que t est un témoin auquel on n'a pas ajouté de soufre élémentaire et qui n'a pas été inoculé. L'utilité de ce témoin est de vérifier la proportion de métaux solubilisés sans l'action des microorganismes.

On remarque tout d'abord la différence de pH initial, entre les duplicatas et les témoins, due à l'acidité de l'inoculum. L'influence de l'acidité de l'inoculum est plus importante pour les

Tableau 5,1: Variation du pH, production de sulfates et oxydation du soufre durant l'essai de biolixiviation

Sol	Concentration (g/l)	pH initial	pH final	Sulfates initial (mg/l)	Sulfates final (mg/l)	% soufre oxydé
Drummondville	15	4,9	0,95	5000	26300	62
	35	7	1,15	5900	27100	64
	55	7,25	1,18	7200	28200	67
Eustis	15	4	1,13	8400	24700	63
	35	4,2	1,16	6900	24800	64
	55	4,4	1,2	7200	25000	65
Sherbrooke	15	3	1,22	6400	18100	51
	35	3,05	1,34	5300	18400	52
	55	3,1	1,44	7100	19300	53

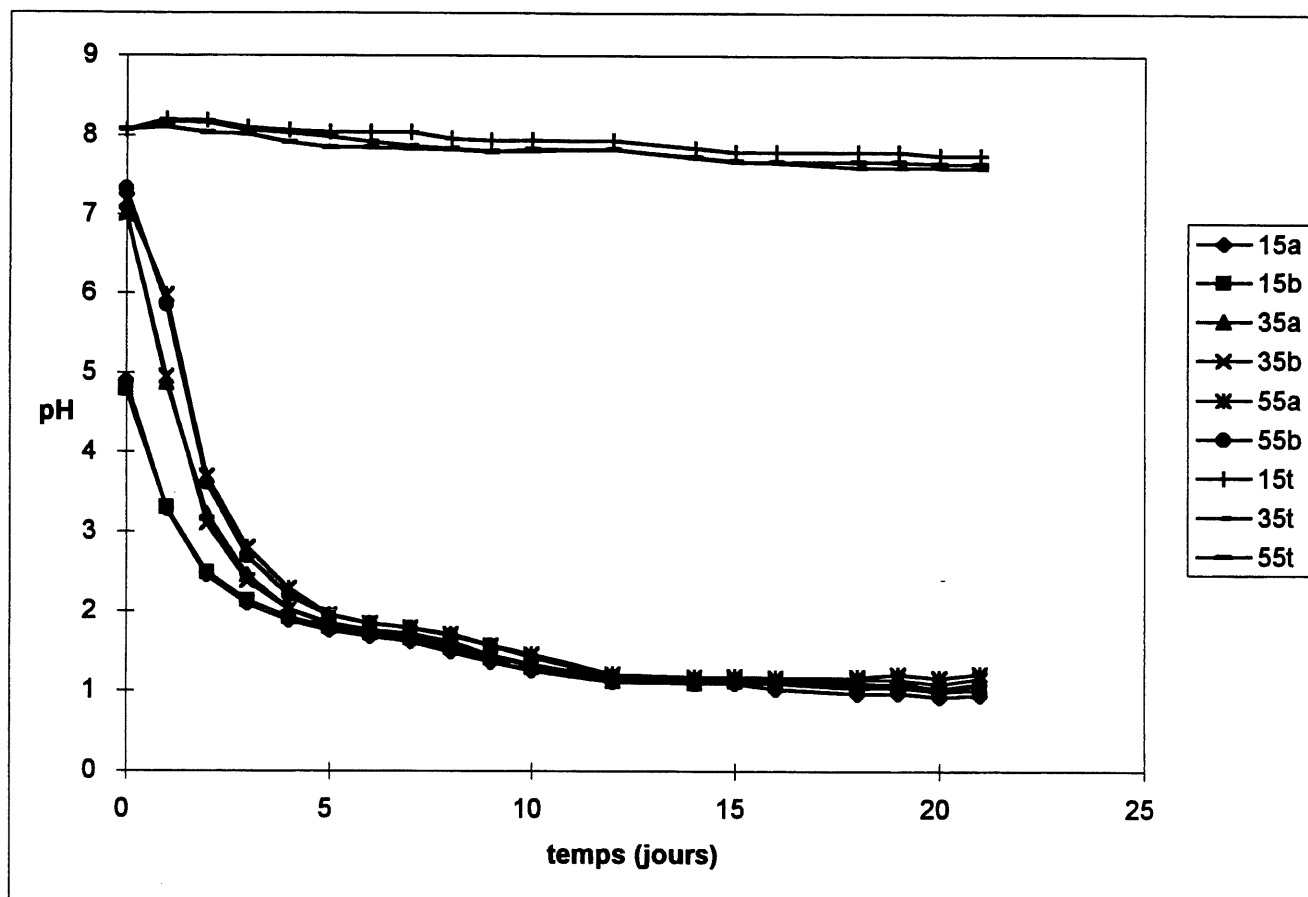


Figure 5.24: Variation du pH lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Drummondville

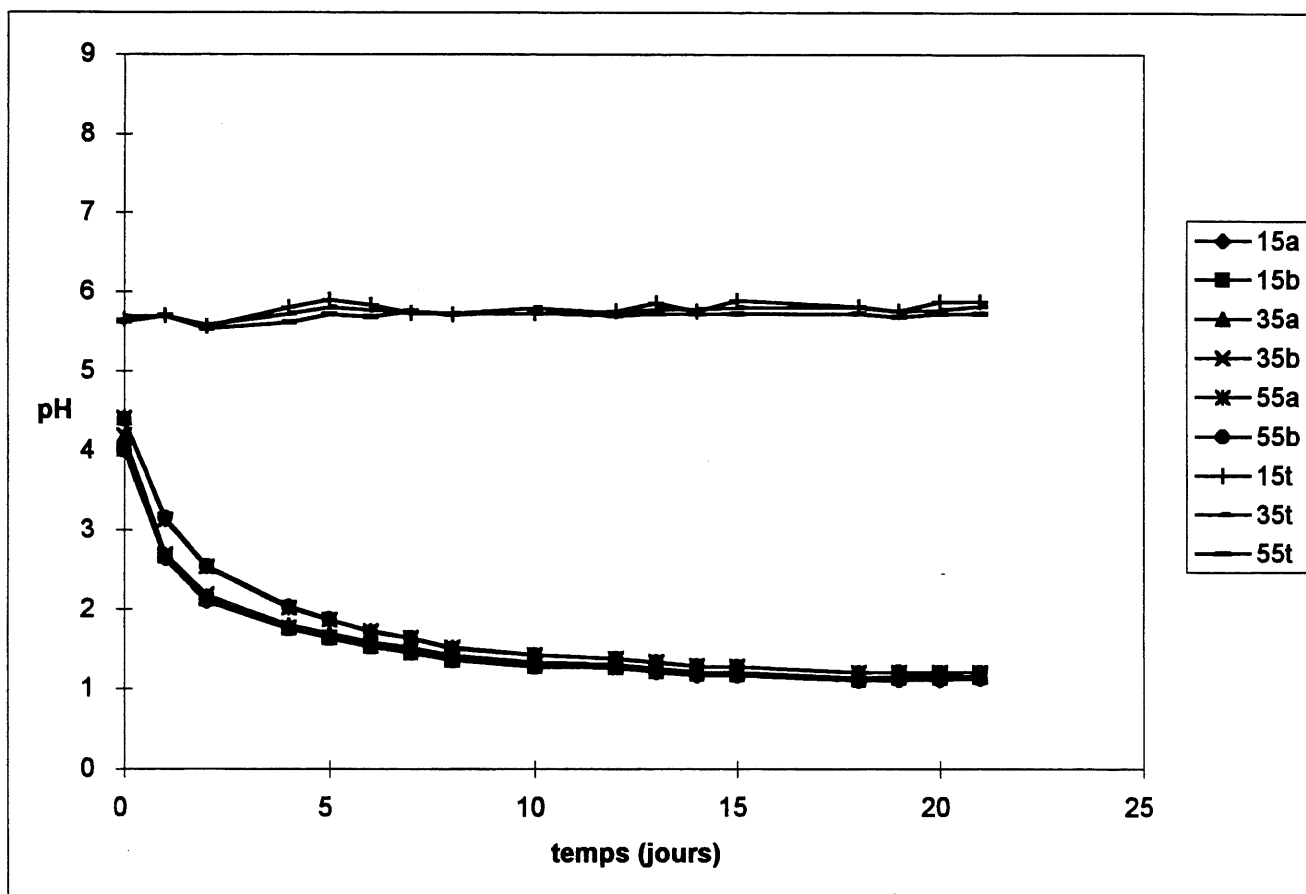


Figure 5.25: Variation du pH lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis

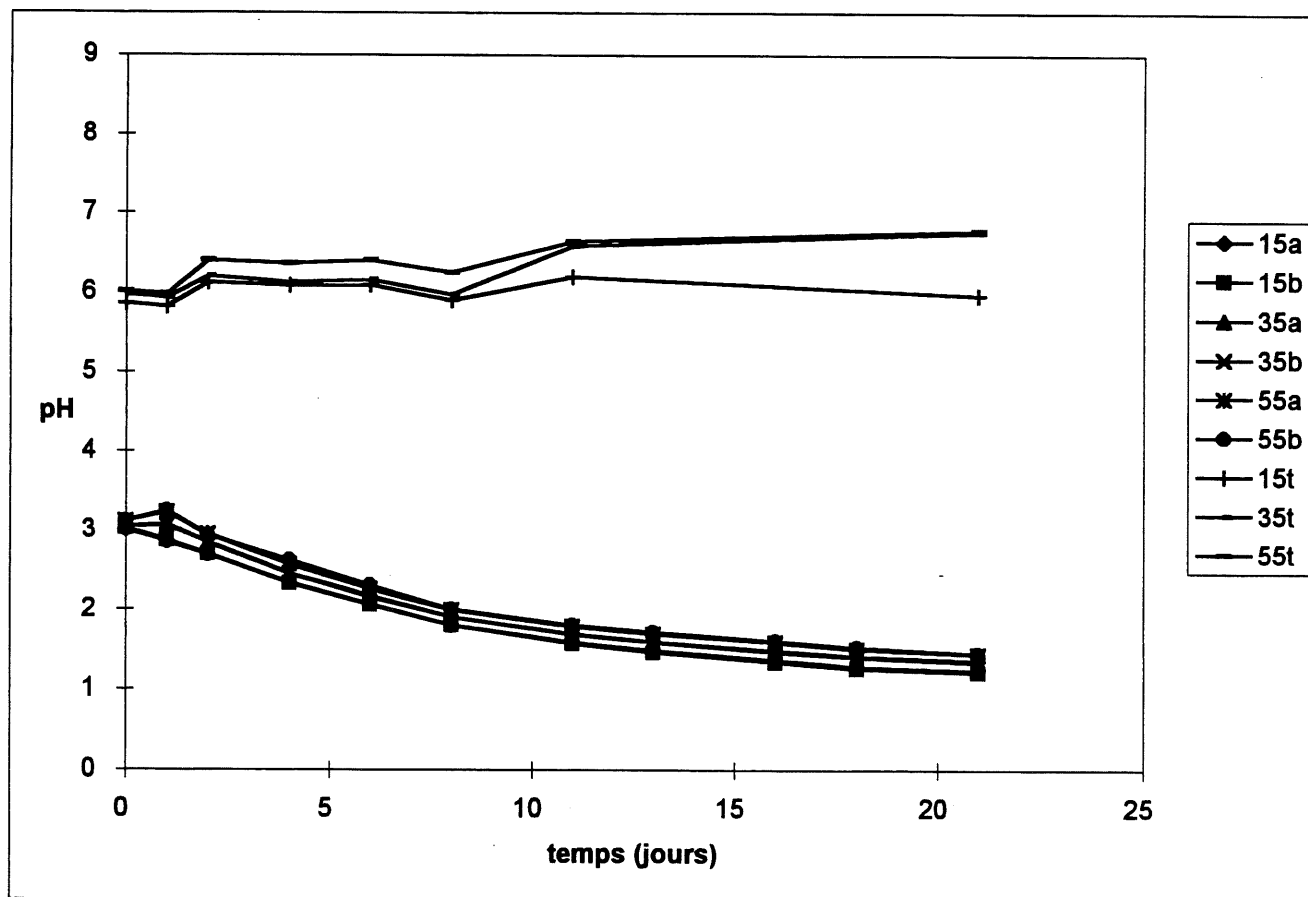


Figure 5.26: Variation du pH lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Sherbrooke

sols de Eustis (figure 5.25) et Sherbrooke (figure 5.26) que pour le sol de Drummondville (figure 5.24) étant donné la capacité tampon plus forte de ce dernier puisque tous les inoculums avaient un pH équivalent. De plus, on remarque pour les trois sols, mais plus particulièrement pour celui de Drummondville, qu'à plus forte concentration de sol dans le mélange, l'influence de l'inoculum sur le pH initial est moins importante, ce en raison de la capacité tampon plus forte à haute qu'à faible concentration .

Après inoculation, le pH initial des sols de Eustis et Sherbrooke était déjà bas soit de l'ordre de 3,0 à 4,4. Ainsi, la chute de pH est due principalement à l'action des bactéries acidophiles. Le sol de Drummondville par contre présentait un pH nettement plus élevé soit de l'ordre de 6 à 7. Cette valeur n'a cependant pas inhibé la croissance des microorganismes oxydant le soufre comme le montre la figure 5.26. Cependant, dans ce cas, il est fort probable que la chute de pH soit due à une action combinée de bactéries acidophiles et non acidophiles.

Les pH finals après 21 jours sont de l'ordre de 0,95 à 1,25 pour le sol de Drummondville, 1,12 à 1,20 pour celui de Eustis et 1,21 à 1,44 pour celui de Sherbrooke. Après 12 à 15 jours cependant, dans tous les cas, la majeure partie de l'acidification est déjà complétée. Pour chacun des sols, une concentration moins élevée de solides a permis d'atteindre une valeur de pH plus basse mais la différence est faible et tend à diminuer avec le temps

(figures 5.24 à 5.26). L'effet de la concentration de solides sera discuté dans un sous chapitre subséquent. Quant aux témoins, on remarque que tel que prévu, leurs valeurs de pH sont demeurées stables tout au long de l'essai.

5.5.2 Variation des sulfates

Les figures 5.27 à 5.29 montrent l'évolution de la concentration de sulfates en fonction du temps pour chacun des sols. Les valeurs correspondent à la moyenne des duplicatas. On remarque immédiatement que la quantité de sulfates initiale (au jour zéro) est assez élevée. Cette quantité de sulfates au départ peut provenir de plusieurs sources dont le sulfate d'ammonium ajouté aux Erlenmeyers, les sulfates ajoutés lors du transfert de l'inoculum et bien sûr les sulfates présents dans le sol vierge. Après analyse des témoins des essais, seul le sol vierge de Drummondville s'est avéré contenir des sulfates en quantités non négligeables. Cependant, l'ajout de sulfates au départ de l'essai ne constitue qu'une petite partie du total des sulfates retrouvés au jour zéro, la plus grande partie ayant été produite par les microorganismes oxydant le soufre dès leur inoculation au milieu expérimental. En effet, afin d'obtenir un mélange complet, un délai de 45 minutes a été respecté avant le premier échantillonnage. Les bactéries transférées étant en pleine phase logarithmique de croissance, l'utilisation du soufre disponible a été immédiate.

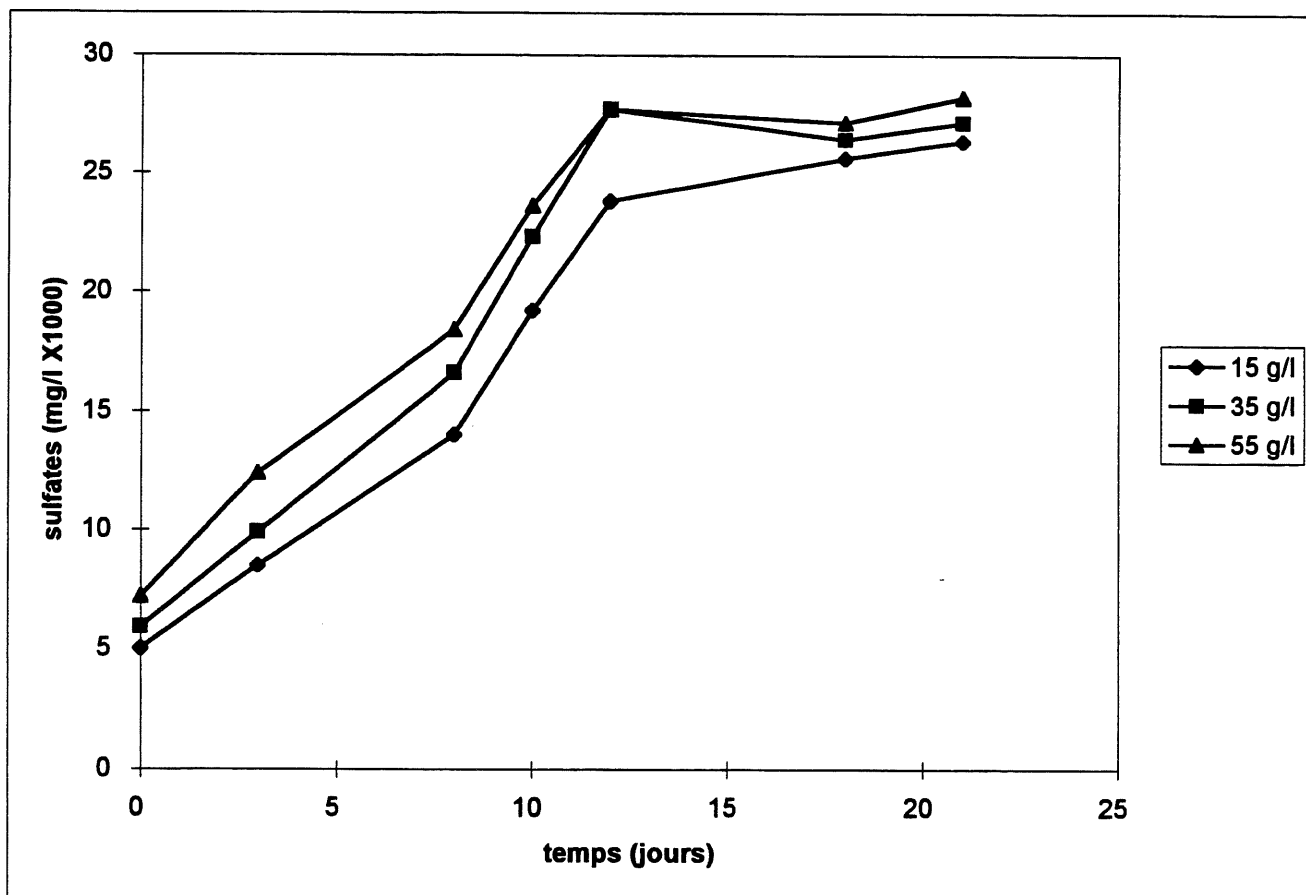


Figure 5.27: Variation des sulfates lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Drummondville

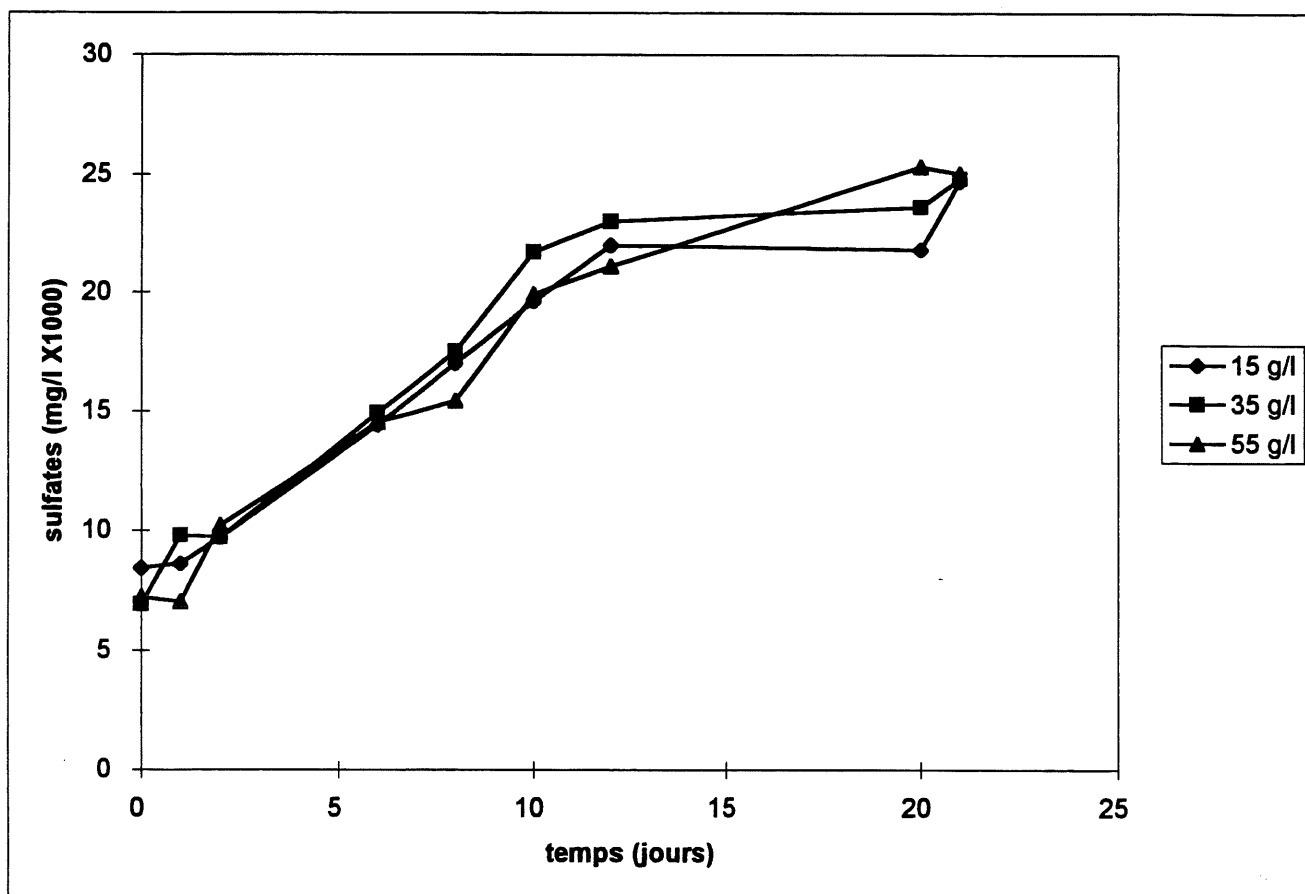


Figure 5.28: Variation des sulfates lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis

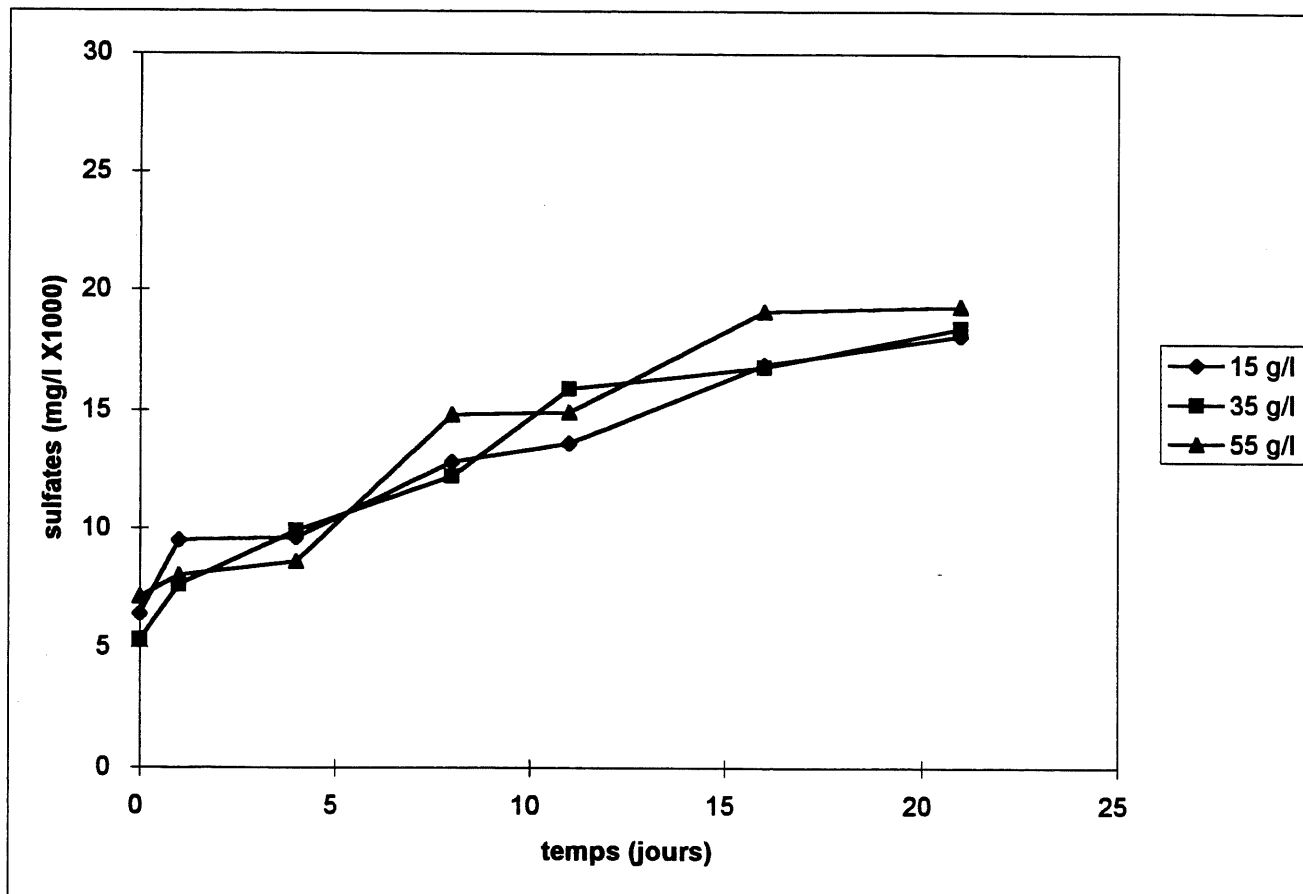


Figure 5.29: Variation des sulfates lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Sherbrooke

Sur les graphiques (figures 5.27 à 5.29), on remarque aussi que pour les trois sols, la production de sulfates a été très rapide pendant les premiers jours pour finalement diminuer après 12 à 15 jours et enfin se stabiliser. Si l'on compare ces graphiques à ceux de l'évolution du pH (figures 5.24 à 5.26), on remarque que la production de sulfates est à peu près inversement proportionnelle à la réduction du pH, ce qui est normal. La fraction de soufre oxydé après les 21 jours d'essai (tableau 5.1) déterminée d'après les quantités de sulfates produites varie entre 51 et 67 % selon le sol et la concentration, ce qui indique que le soufre était présent en quantités excédentaires dans les mélanges et n'a pas été le facteur limitant pour la croissance des microorganismes.

L'effet de la concentration de solides sur la production des sulfates sera discuté dans un sous-chapitre subséquent.

5.5.3 Solubilisation des métaux

Le Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec classifie le degré de contamination en métaux des sols de A à C en ordre croissant. Les sols étudiés pendant cette étude peuvent être classés de la façon suivante:

- Le sol de Drummondville se situe entre les catégories A et B pour le zinc.
- le sol de Eustis excède la catégorie C pour le plomb et le

cuivre et la catégorie B pour le zinc.

- le sol de Sherbrooke est légèrement inférieur à la catégorie B pour le zinc
- le sol de Montréal excède la catégorie C pour le plomb, le cuivre ainsi que le nickel et la catégorie B pour le zinc et le cadmium.

Le manganèse ne fait pas l'objet de recommandations par le MEF en ce qui a trait à la concentration dans les sols.

Les figures 5.30 à 5.37 montrent l'évolution de la solubilisation des métaux en fonction du temps pour chaque sol et chaque métal étudié. Les témoins ne sont pas inclus puisque dans tous les cas, aucune solubilisation n'a été remarquée (valeurs non détectables)

Si l'on regarde l'évolution de la solubilisation du manganèse, on remarque que pour le sol de Drummondville (figure 5.30), le taux de solubilisation est très élevé lors des 4 premiers jours puis diminue par la suite sans vraiment se stabiliser sauf peut être vers les derniers jours de l'essai. Pour le sol de Eustis (figure 5.32), la majeure partie de la solubilisation s'effectue dès les 6 premiers jours après lesquels on a pratiquement atteint le maximum de métaux solubles. Le taux de solubilisation par la suite est très faible et on observe même une légère reprécipitation après 12 jours dans les Erlenmeyers avec 55

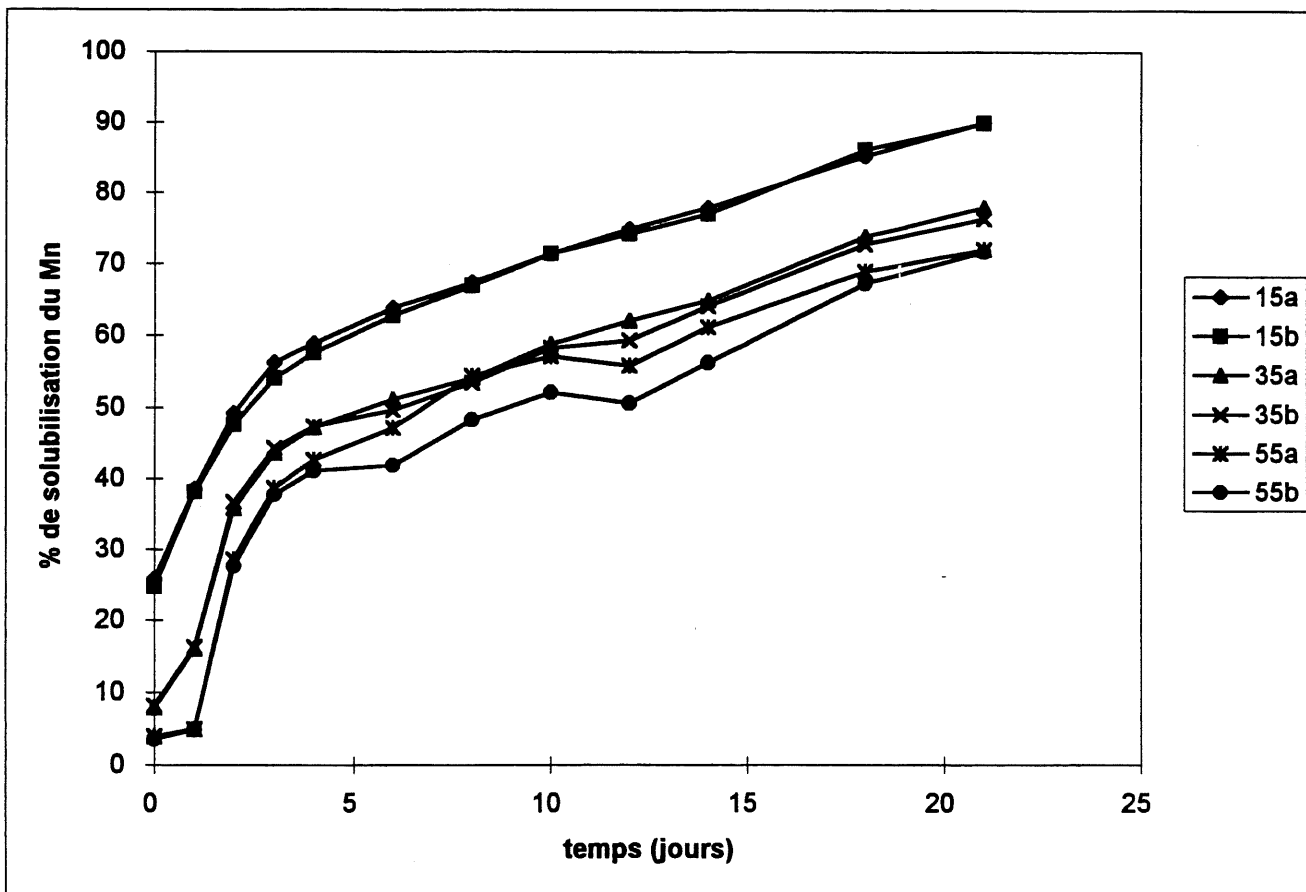


Figure 5.30: % d'enlèvement du manganèse lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Drummondville

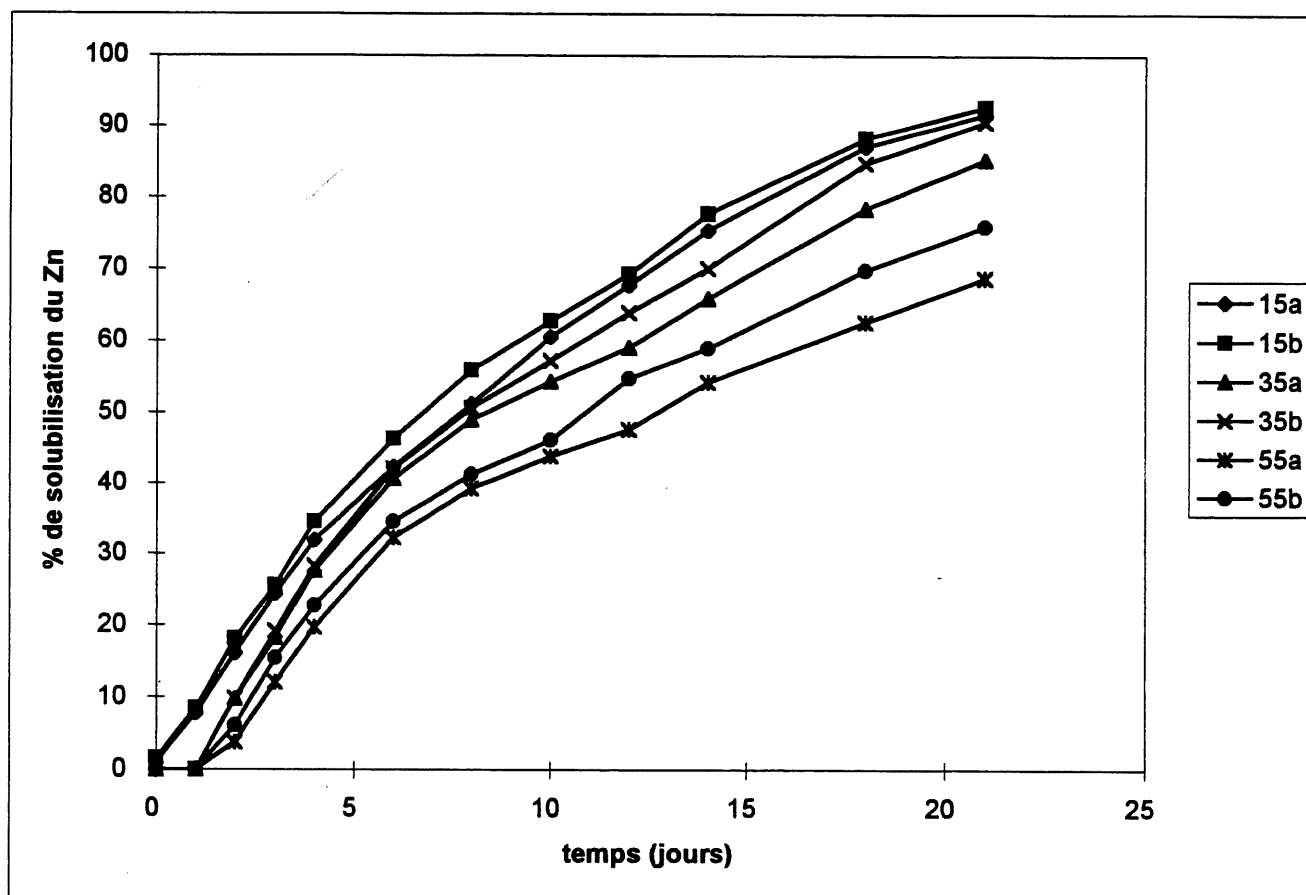


Figure 5.31: % d'enlèvement du zinc lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Drummondville

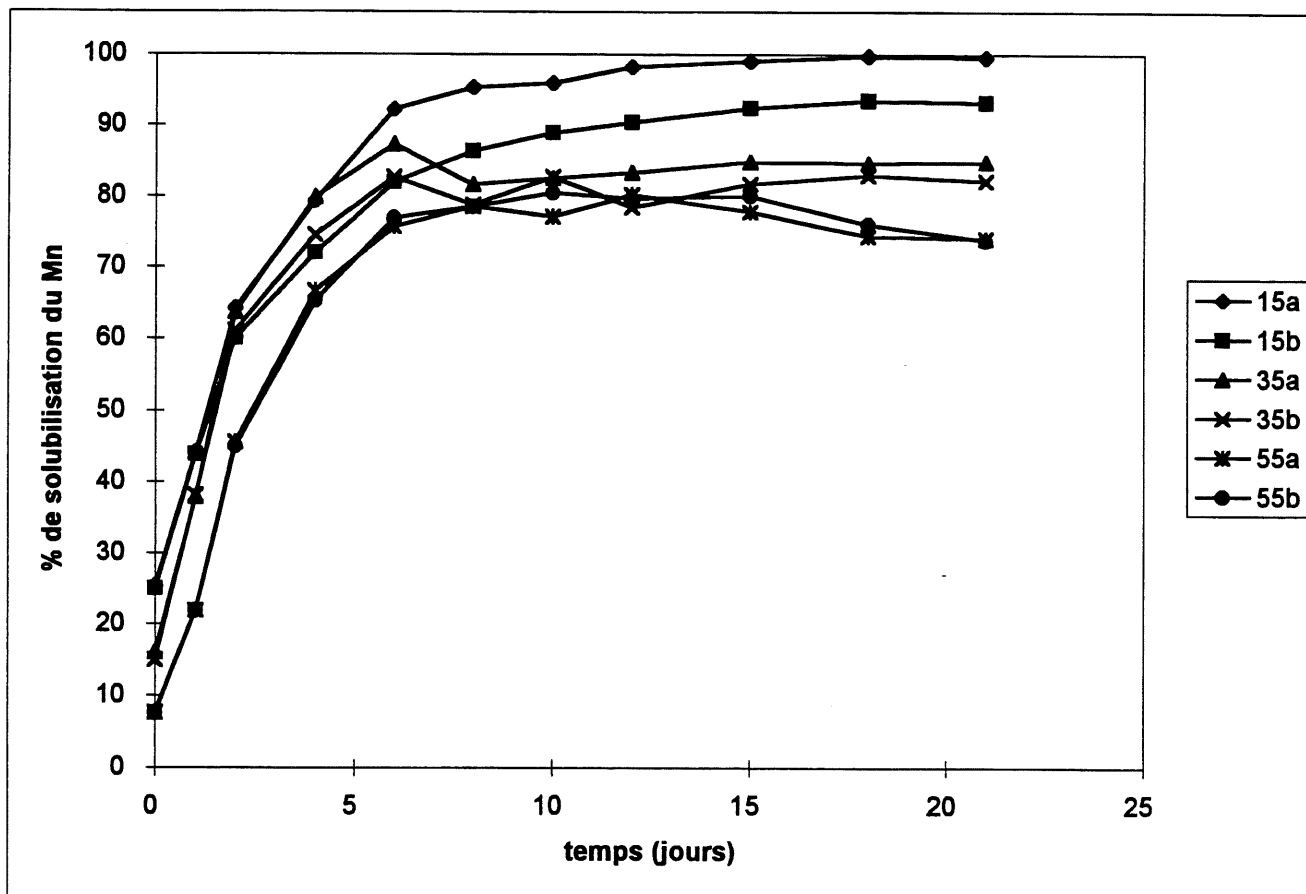


Figure 5.32: % d'enlèvement du manganèse lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis

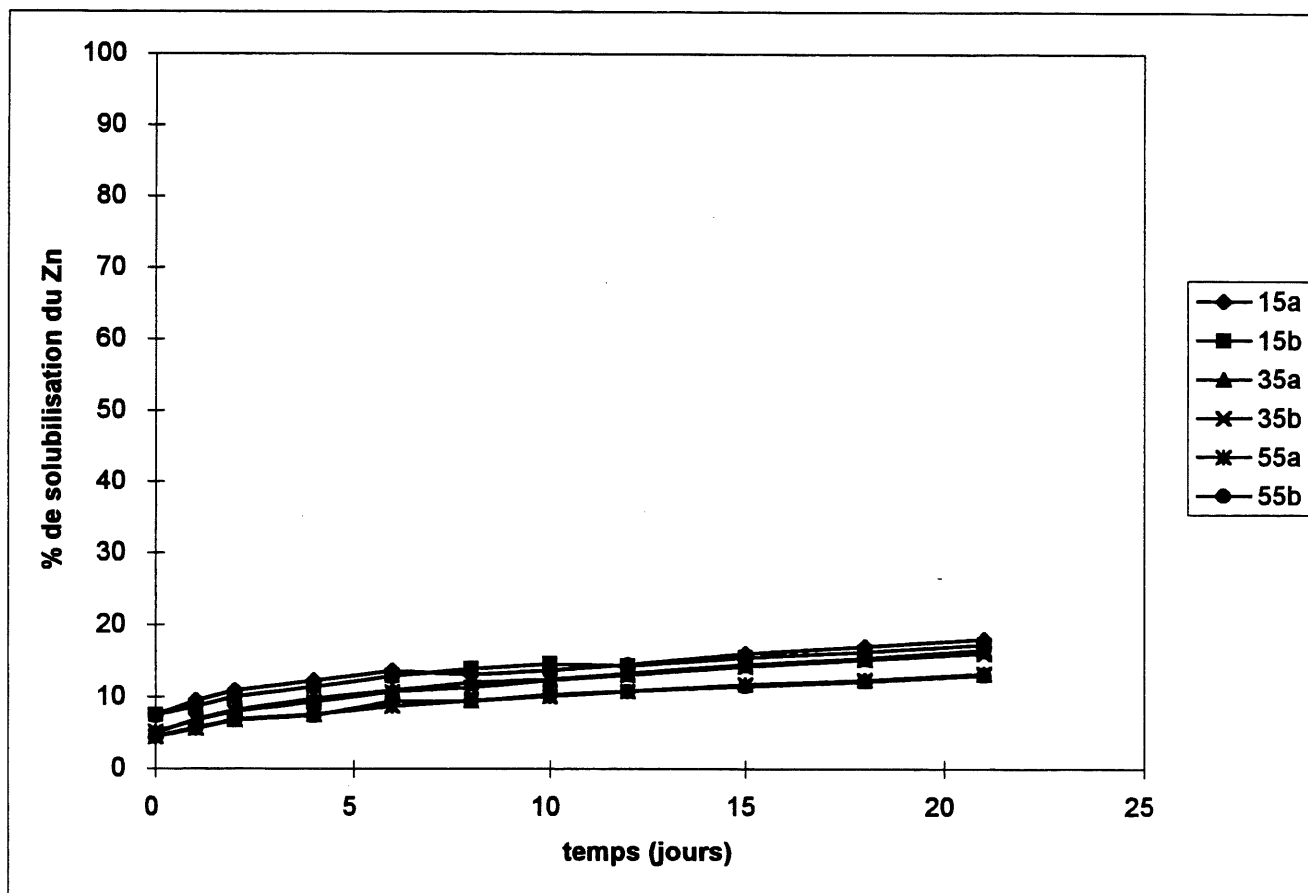


Figure 5.33: % d'enlèvement du zinc lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis

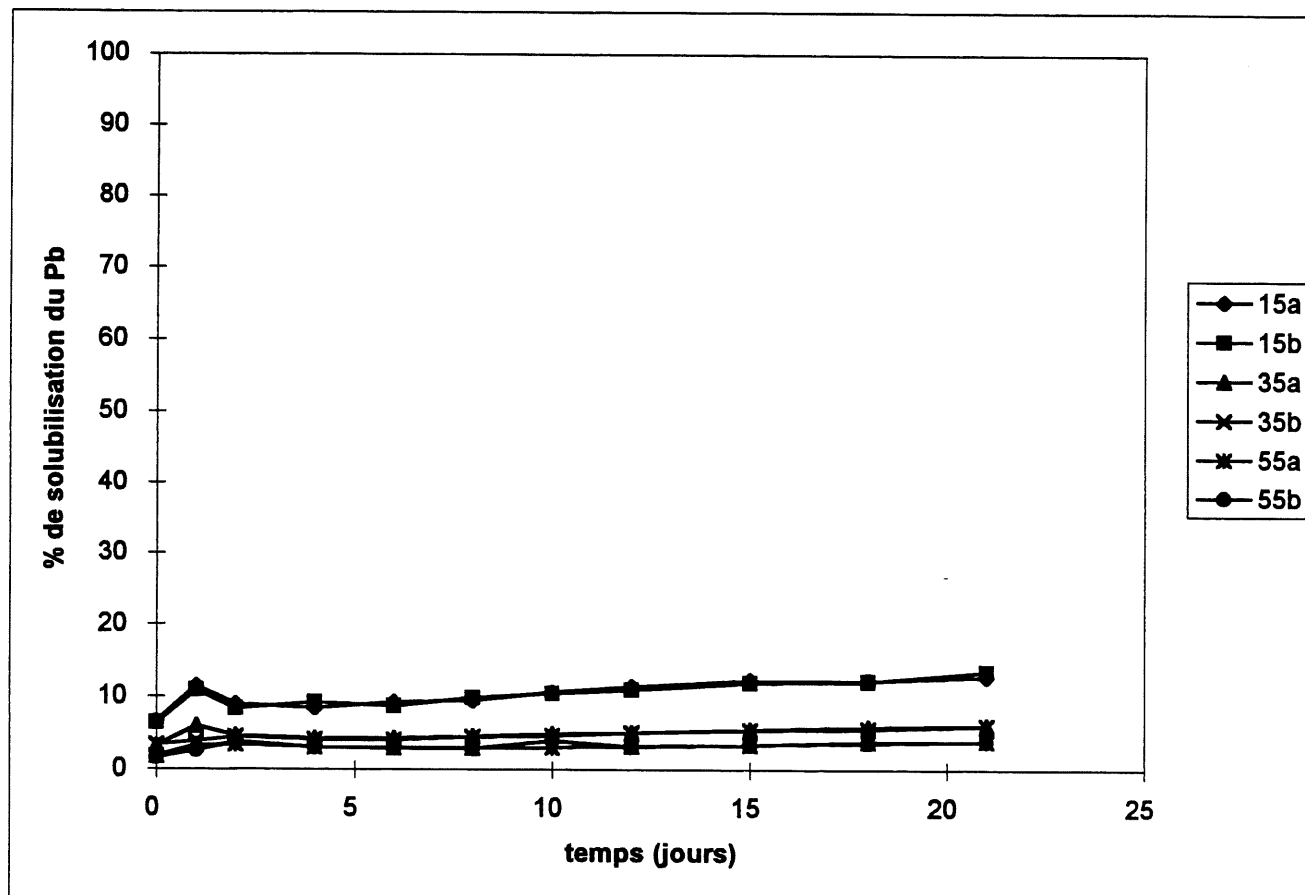


Figure 5.34: % d'enlèvement du plomb lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis

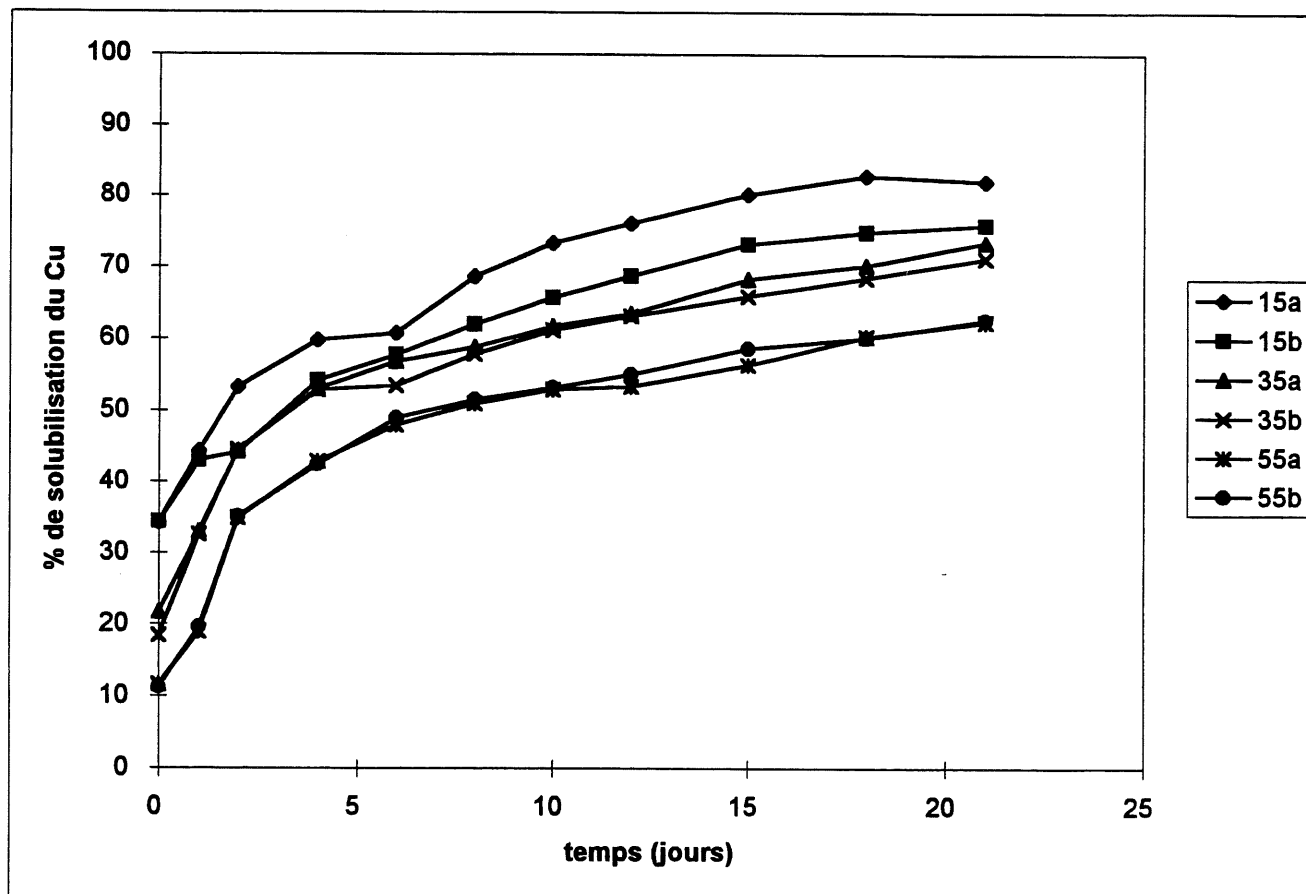


Figure 5.35: % d'enlèvement du cuivre lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Eustis

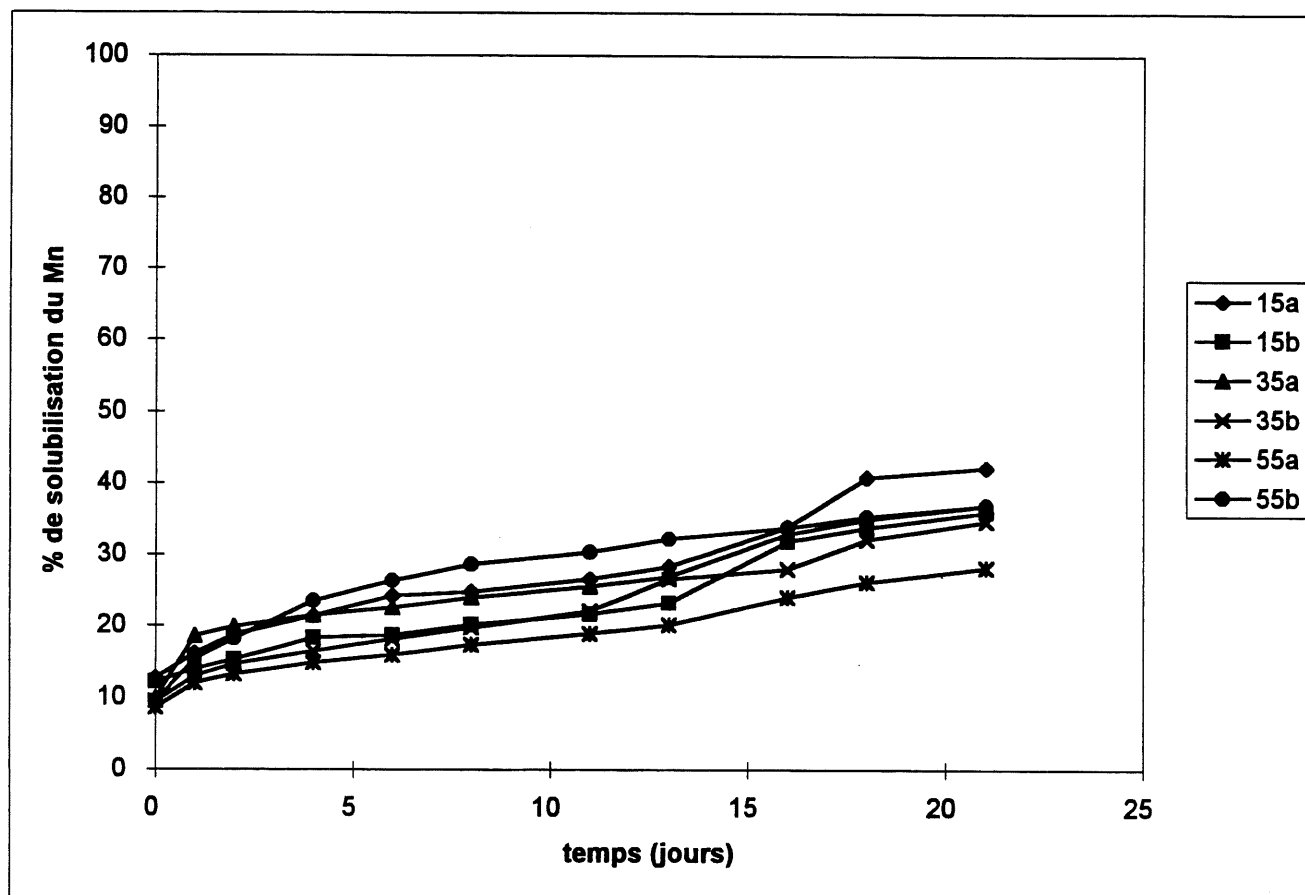


Figure 5.36: % d'enlèvement du manganèse lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Sherbrooke

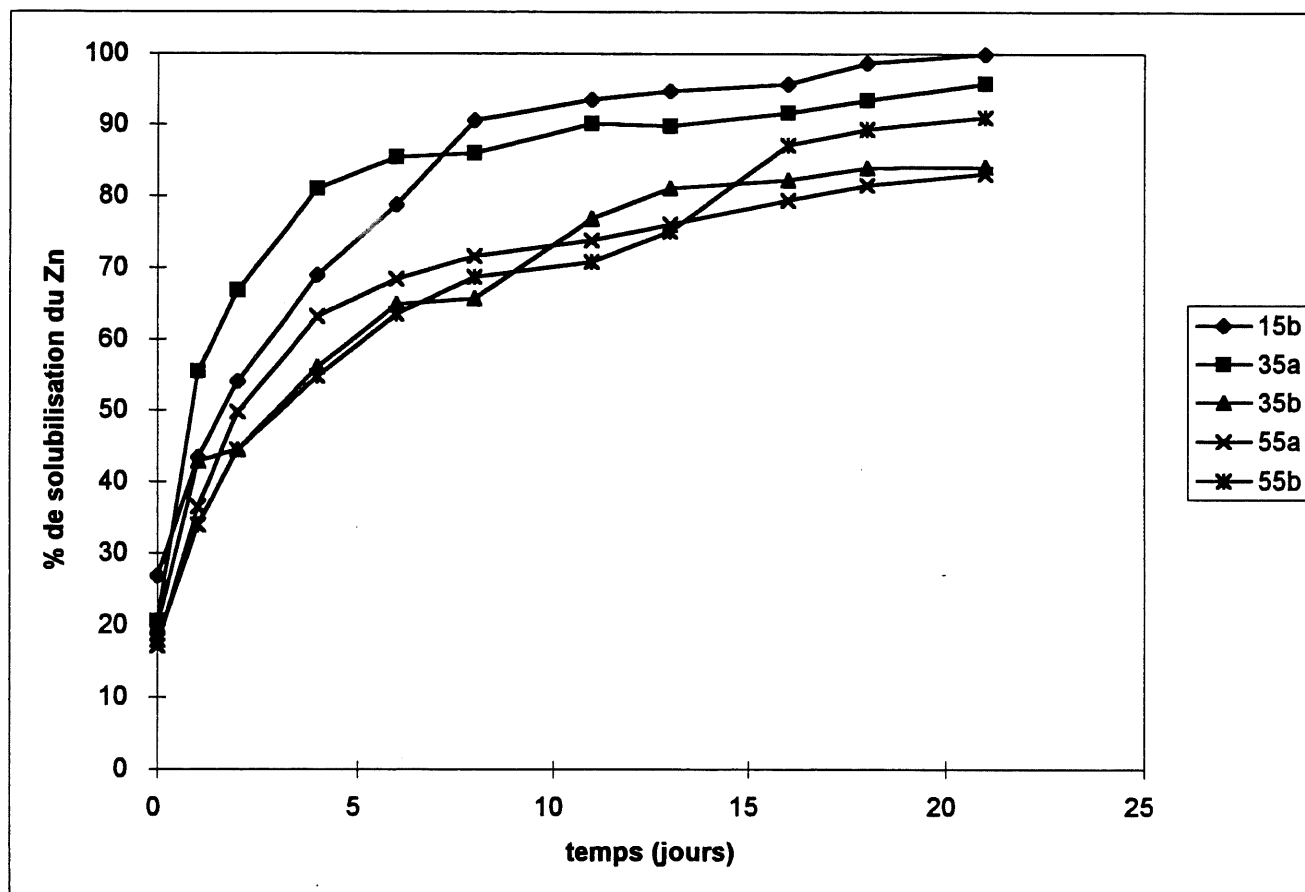


Figure 5.37: % d'enlèvement du zinc lors de l'essai de biolixiviation avec le sol de Sherbrooke

g/l de sol. Quant au sol de Sherbrooke (figure 5.36) , on remarque aussi une solubilisation rapide le premier jour mais le taux diminue de beaucoup par la suite et semble vouloir se stabiliser après 21 jours. Fait à noter, pour les trois sols, on remarque qu'une partie du manganèse se solubilise immédiatement après l'inoculation. Cette solubilisation initiale est due à l'acidification du milieu par l'inoculum et par la production d'acide immédiate des bactéries puisque les témoins non inoculés n'ont montré aucune solubilisation.

Si l'on regarde maintenant l'évolution de la solubilisation du zinc, on remarque que pour le sol de Drummondville (figure 5.31), il n'y a pas de solubilisation initiale (au jour 0) mais comme pour le manganèse, le taux est maximum pour les 6 premiers jours puis diminue par la suite sans vraiment se stabiliser sauf vers les tout derniers jours de l'essai. Dans le cas du sol de Eustis (figure 5.33), on remarque une légère solubilisation initiale et par la suite, un taux très faible et relativement constant jusqu'à la fin de l'essai. Enfin, pour le sol de Sherbrooke (figure 5.37), on observe une forte solubilisation dès l'inoculation au jour 0 suivie d'un fort taux durant les six premiers jours de l'essai puis d'une stabilisation vers un plateau maximum par la suite. Il est à noter que dans ce dernier cas, pour des raisons techniques, le duplicata 15a n'a pu être étudié.

Pour ce qui est du plomb et du cuivre, seul le sol de Eustis en contenait en concentrations détectables au spectrophotomètre à

absorption atomique. Le plomb (figure 5.34), tel que prévu, n'a pas été efficacement solubilisé. Une très faible partie fut solubilisée dès le jour initial mais par la suite le taux de solubilisation est demeuré très minime. Par contre, le cuivre (figure 5.35) a été fortement solubilisé dès l'inoculation et un fort taux de solubilisation a été observé durant les deux premiers jours de l'essai. Par la suite, le taux a diminué progressivement pour finalement atteindre un plateau de solubilisation maximum vers la fin de l'essai.

L'analyse de ces résultats montre qu'il existe plus de similitudes entre les modèles de solubilisation d'un même sol qu'entre ceux d'un même métal. En effet, le sol de Drummondville montre une évolution de la solubilisation semblable pour le zinc et le manganèse soit un taux de solubilisation élevé et de courte durée suivi d'un taux plus faible et constant n'atteignant un plateau de solubilisation que vers la fin de l'essai. Le sol de Eustis montre un modèle semblable entre le manganèse et le cuivre soit un taux très rapide menant à une solubilisation maximum en un temps très court. Le zinc et le plomb, vu leur faible taux de solubilisation, ne peuvent être comparés. Quant aux modèles de solubilisation du sol de Sherbrooke, ils sont semblables pour le manganèse et le zinc. Cependant, malgré ces similitudes, on ne peut affirmer que le type de sol soit le seul facteur déterminant le type d'évolution de la solubilisation.

Les figures 5.38 à 5.40 montrent, pour les trois concentrations de solides respectivement, une comparaison entre les divers sols et chacun des métaux de la valeur maximale de solubilisation atteinte après 21 jours (moyenne des duplicatas). On remarque qu'indépendamment des concentrations de solides, les résultats sont très variables. En effet, le manganèse est facilement solubilisé pour le sol de Eustis (74-96%) mais demeure très insoluble dans le sol de Sherbrooke (33-39%). A l'inverse, on obtient de très bons résultats pour le zinc avec le sol de Sherbrooke (87-100%), ce qui l'amène sous le critère A du MEF, mais la solubilisation est beaucoup plus faible pour le sol de Eustis (13-18%) qui demeure au dessus du critère B. Le sol de Drummondville quant à lui montre d'excellents pourcentages de solubilisation pour le manganèse (72-90%) et le zinc (72-92) (critère A atteint). Enfin, dans le sol de Eustis, le plomb est comme prévu très difficile à solubiliser (4-13%). Par contre, le pourcentage d'enlèvement du cuivre est très intéressant (63-79%), ce qui l'amène près du critère B du MEF. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Blais et al. [63] avec le même procédé mais avec des boues d'épuration soient: Mn $92 \pm 7\%$; Zn $85 \pm 10\%$; Pb $27 \pm 21\%$; Cu $75 \pm 21\%$. Les résultats de Zagury et al. [67] sur la biolixiviation des métaux dans les sols mais avec le procédé utilisant le fer ionique comme substrat sont aussi variables que ceux de cette expérimentation. Les valeurs de solubilisation qu'ils ont obtenues avec un mélange à 15 g/l de solides pour différents sols sont de l'ordre de 35-97% pour le Mn,

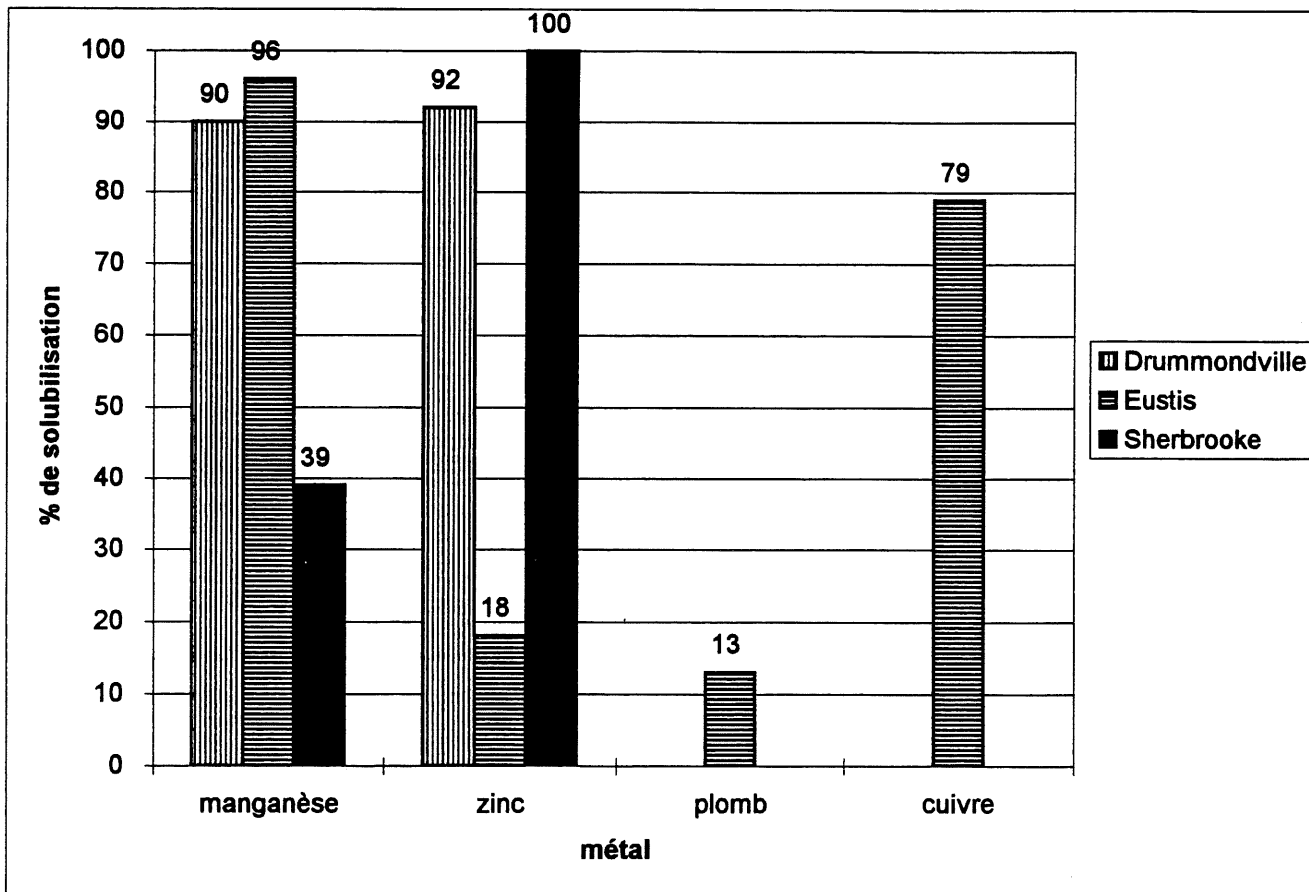


Figure 5.38: Comparaison des taux de solubilisation à 15 g/l

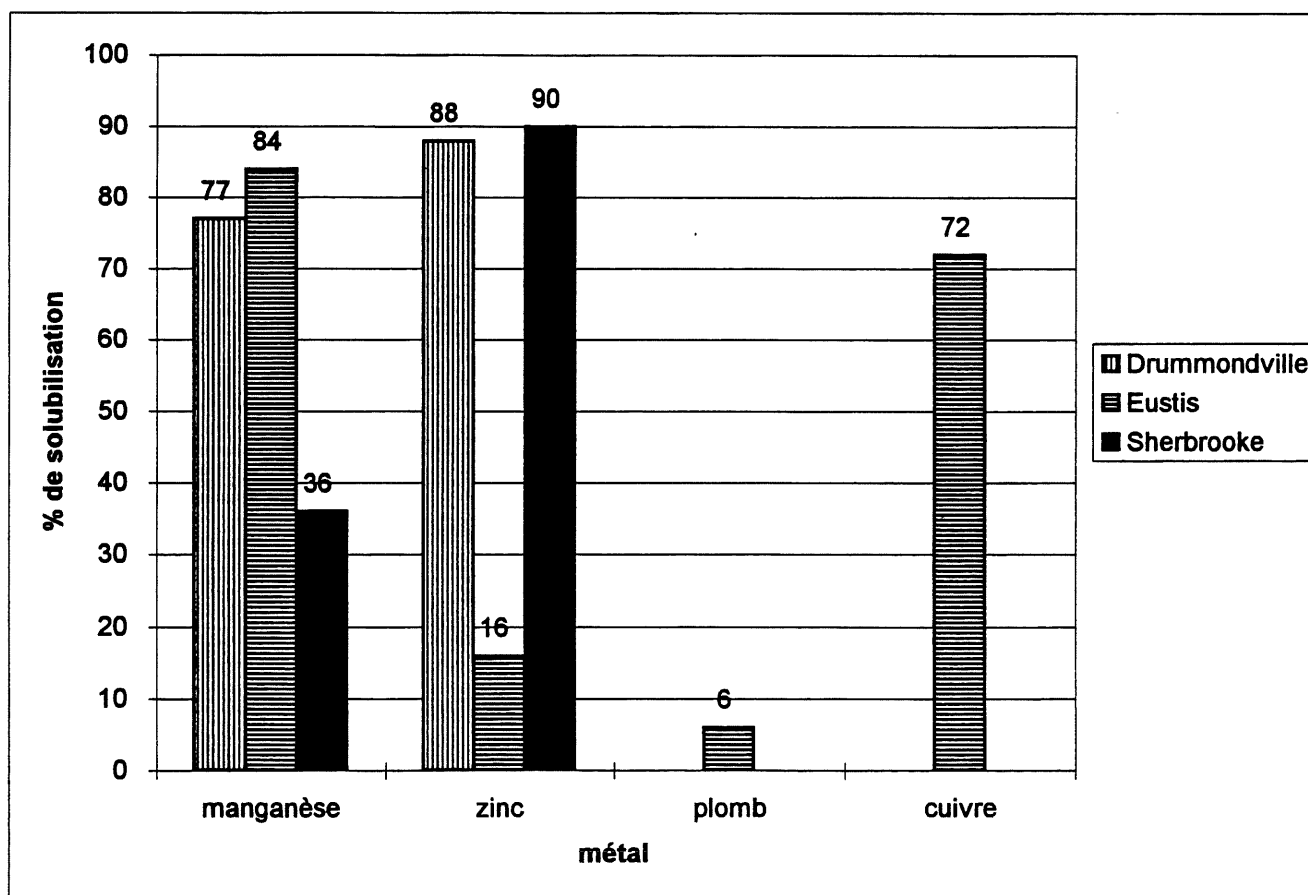


Figure 5.39: Comparaison des taux de solubilisation à 35 g/l

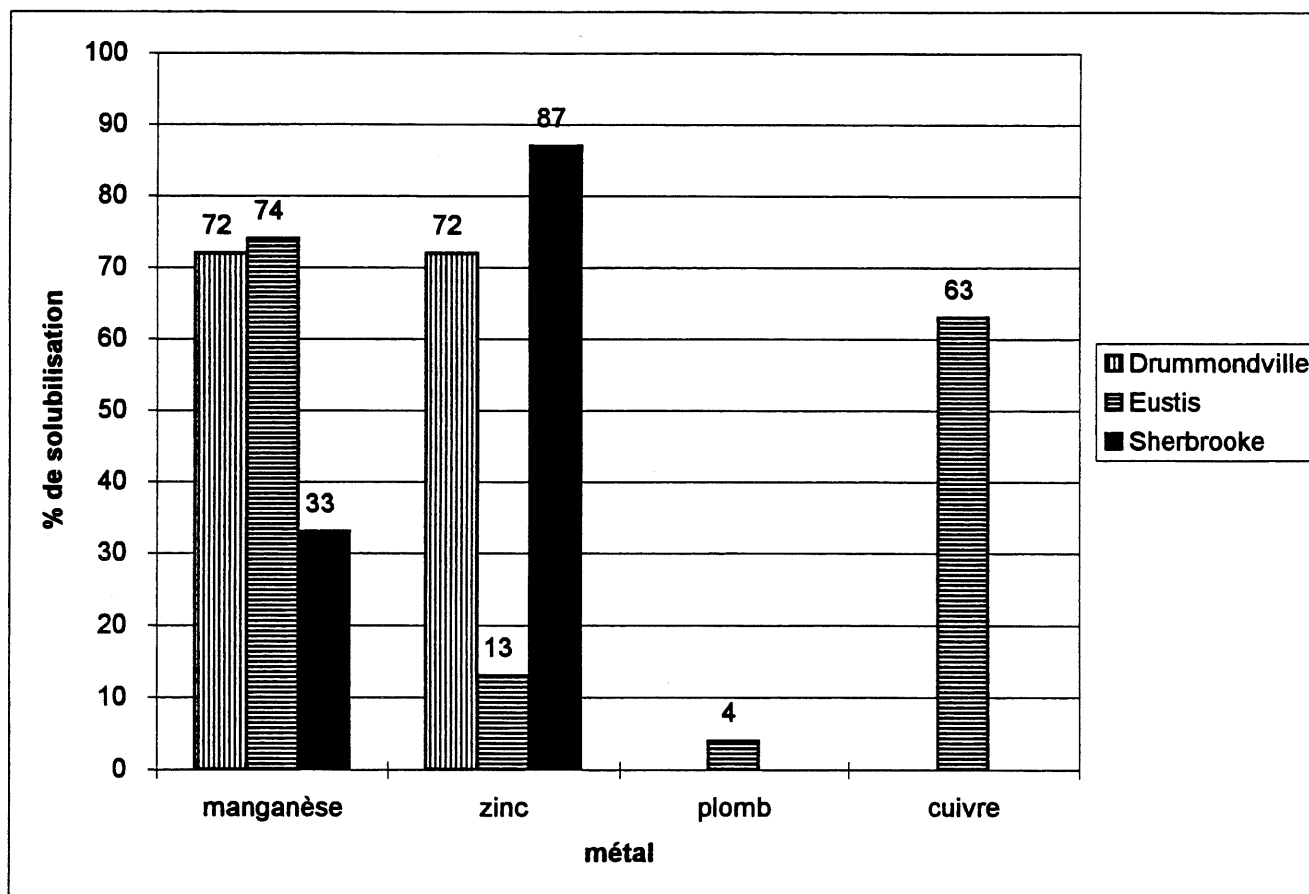


Figure 5.40: Comparaison des taux de solubilisation à 55 g/l

18-96% pour le Zn et 35-66% pour le Cu. On remarque donc que l'efficacité de la solubilisation ne dépend pas seulement du type de sol ou de métal mais aussi d'autres facteurs. La forme sous laquelle on retrouve le métal dans le sol peut influencer les résultats. En effet, selon Tyagi et Couillard [28], les sulfures de métaux ne sont pas solubilisables par T. thiooxidans. Ainsi, une quantité importante de sulfures de métaux dans les sols peut réduire l'efficacité du procédé. Cependant, un autre facteur important doit être considéré soit la spéciation des métaux [28,67,77].

5.5.4 Spéciation des métaux

L'utilisation de la concentration totale de métaux comme critère permettant d'évaluer les effets potentiels d'une contamination implique que chaque forme d'un métal donné a un impact équivalent sur l'environnement. Une telle supposition est clairement insoutenable [77]. Les métaux lourds peuvent être présents dans le sol sous différentes formes. On peut les classer de la façon suivante: échangeables, liés aux carbonates, liés aux oxydes de fer et de manganèse, liés à la matière organique et résiduels. [6,77]. Les quatre premières fractions peuvent sous certaines conditions naturelles être libérées et se retrouver dans la nappe phréatique ou dans les cours d'eau. Par contre, la fraction résiduelle consiste en métaux trace contenus dans la structure cristalline de minéraux primaires et secondaires. Il est

peu probable que ces métaux soient libérés en solution sous les conditions rencontrées normalement dans la nature [77].

Afin de vérifier l'importance de la spéciation sur la solubilisation des métaux, des essais ont été effectués sur les différents sols selon la méthode développée par Tessier et al. [77]. Le tableau 5.2 présente les résultats de cette étude et les compare avec les résultats de l'essai de biolixiviation à 15 g/l. On remarque qu'en général, pour chacun des sols, l'efficacité de la biolixiviation pour un métal donné est liée à l'importance de la fraction résiduelle. Ceci est particulièrement remarquable pour le Zn dans le sol de Eustis et le Mn dans celui de Sherbrooke. La fraction résiduelle dans ces deux cas est respectivement de 84,6 et 85,4 % tandis que la biolixiviation a permis de solubiliser seulement 18% du Zn pour Eustis et 39 % du Mn pour Sherbrooke. La fraction résiduelle est donc habituellement beaucoup plus difficile à solubiliser que les autres fractions. Cependant, les métaux résiduels ne sont pas toujours impossible à solubiliser avec la biolixiviation. Par exemple, pour le sol de Drummondville, la fraction échangeable du Zn et du Mn est inexistante alors que la fraction résiduelle de ces deux métaux est de 54 et 59 % respectivement (tableau 5.2). Cependant, cette importante fraction résiduelle n'a pas affecté négativement l'efficacité du procédé puisque les valeurs de solubilisation atteintes ont été de 92% pour le Zn et de 90% pour le Mn. Il est possible que la nature plus fine du sol de Drummondville contrairement à la nature plus

Tableau 5.2: Spéciation des métaux dans les sols étudiés

Sol	métal	fraction	% du total des métaux	% d'enlèvement lors de la biolixiviation à 15 g/l
Drummondville	manganèse	échangeables	0	90
		liés aux carbonates	18	
		liés aux oxydes de Fe et Mn	15	
		liés à la matière organique	8	
		résiduels	59	
Eustis	zinc	échangeables	0	92
		liés aux carbonates	3,2	
		liés aux oxydes de Fe et Mn	25,5	
		liés à la matière organique	17,4	
		résiduels	54	
	manganèse	échangeables	1,1	96
		liés aux carbonates	1,5	
		liés aux oxydes de Fe et Mn	58,5	
		liés à la matière organique	2,6	
		résiduels	36,3	
	zinc	échangeables	5,3	18
		liés aux carbonates	0,8	
		liés aux oxydes de Fe et Mn	8,2	
		liés à la matière organique	1,1	
		résiduels	84,6	
	plomb	échangeables	25	13
		liés aux carbonates	18	
		liés aux oxydes de Fe et Mn	23	
		liés à la matière organique	12	
		résiduels	22	
Sherbrooke	cuivre	échangeables	2,2	79
		liés aux carbonates	15,5	
		liés aux oxydes de Fe et Mn	42,1	
		liés à la matière organique	6,7	
		résiduels	33,5	
	manganèse	échangeables	5,7	39
		liés aux carbonates	2,3	
		liés aux oxydes de Fe et Mn	5,6	
		liés à la matière organique	1	
		résiduels	85,4	
	zinc	échangeables	13,2	100
		liés aux carbonates	28,6	
		liés aux oxydes de Fe et Mn	52,5	
		liés à la matière organique	1	
		résiduels	4,7	

grossière des deux autres sols ait permis cette meilleure efficacité.

Tel qu'indiqué précédemment, la fraction résiduelle ne représente qu'un faible degré de toxicité potentiel. Si l'on ne tient compte que des quatre autres fractions, on peut supposer d'après le tableau 5.2 que l'enlèvement des métaux a été pratiquement total dans tous les cas. Cependant, le plomb est une exception. Pour ce métal, la spéciation ne peut expliquer uniquement les faibles résultats de solubilisation obtenus. En effet, sa faible constante de solubilisation le défavorise par rapport aux autres métaux et ions. De plus, le procédé de biolixiviation libère de grandes quantités de sulfates qui, en se liant au plomb, forment des sulfates de plomb, un composé hautement insoluble. Ainsi, une grande partie du plomb solubilisé est rapidement reprecipité, réduisant par ce fait l'efficacité de la biolixiviation.

5.5.5 Effets de la concentration de solides

Si l'on se réfère aux figures 5.24 à 5.26 montrant l'évolution du pH en fonction du temps pour les essais, on peut voir que pour une concentration en solides plus élevée, la réduction du pH est comparativement plus graduelle. Ce phénomène peut être expliqué de la façon suivante: une concentration de sol plus élevée dans le mélange induit un plus grand effet tampon et par ce fait ralentit l'acidification en prévenant une baisse de pH

rapide.

Selon le tableau 5.1 et les figures 5.27 à 5.29, la production de sulfates et donc d'acide est influencée par la concentration de solides. En effet, on remarque que dans les mélanges à concentration de sol plus élevée, la production d'acide est supérieure malgré le fait que la baisse de pH soit plus graduelle. Différentes hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Par exemple, la croissance des microorganismes est influencée par plusieurs facteurs comme la température, la concentration d'oxygène, la disponibilité des nutriments, le pH du milieu, etc. [28]. Si l'on regarde l'utilisation du soufre durant tous les essais, on remarque que de 33 à 49 % du soufre élémentaire ajouté n'a pas été utilisé. Il est donc raisonnable de penser que le soufre n'est pas le facteur limitant de la croissance des bactéries. De même, l'azote ayant été ajouté sous forme de sulfate d'ammonium selon des concentrations recommandées, rien ne nous porte à croire que ce soit un facteur limitant. Cependant, plusieurs autres micronutriments et métaux traces sont essentiels à la croissance des microorganismes oxydant le soufre et sont fournis par le sol lui-même. Il est fort possible que l'un ou plusieurs de ces micronutriments ou métaux trace soient des facteurs limitants de la croissance. Dans ce cas, une plus grande concentration de sol dans le mélange signifierait une plus grande disponibilité de nutriments essentiels et donc une meilleure croissance des bactéries et une production d'acide supérieure, ce

qui est le cas dans cette expérience. Une autre explication vient du fait qu'un changement de pH du milieu peut avoir un effet sur la croissance des bactéries et donc sur la production d'acide [66]. Ainsi, le pH peut devenir un facteur limitant pour la croissance des microorganismes oxydant le soufre. Tel que remarqué précédemment, la chute de pH est plus rapide pour les mélanges à plus faible concentration de sol. Le pH auquel la croissance des bactéries, et donc la production d'acide, est inhibée est donc atteint plus rapidement, ce qui signifie une concentration finale moins élevée en sulfates.

Ainsi, il semble que l'effet tampon dû à la concentration de solides plus élevée soit suffisant pour causer une baisse de pH plus graduelle malgré une production d'acide plus élevée.

La figure 5.41 montre une comparaison des rendements de solubilisation atteints après 21 jours aux trois concentrations de solides étudiées et pour chacun des sols et des métaux. Sur cette figure, on remarque que dans tous les cas, une hausse de la concentration en solides entraîne une réduction du niveau de solubilisation. Les écarts de solubilisation entre les concentrations de 15 g/l et de 55 g/l sont de l'ordre de 13 à 28 % sauf dans le cas du plomb pour le sol de Eustis qui, avec un écart de 69 % (4-13%) semble être plus influencé par la différence de concentration de solides. Il a été démontré pour les boues d'épuration que la solubilisation des métaux ne dépend pas de la

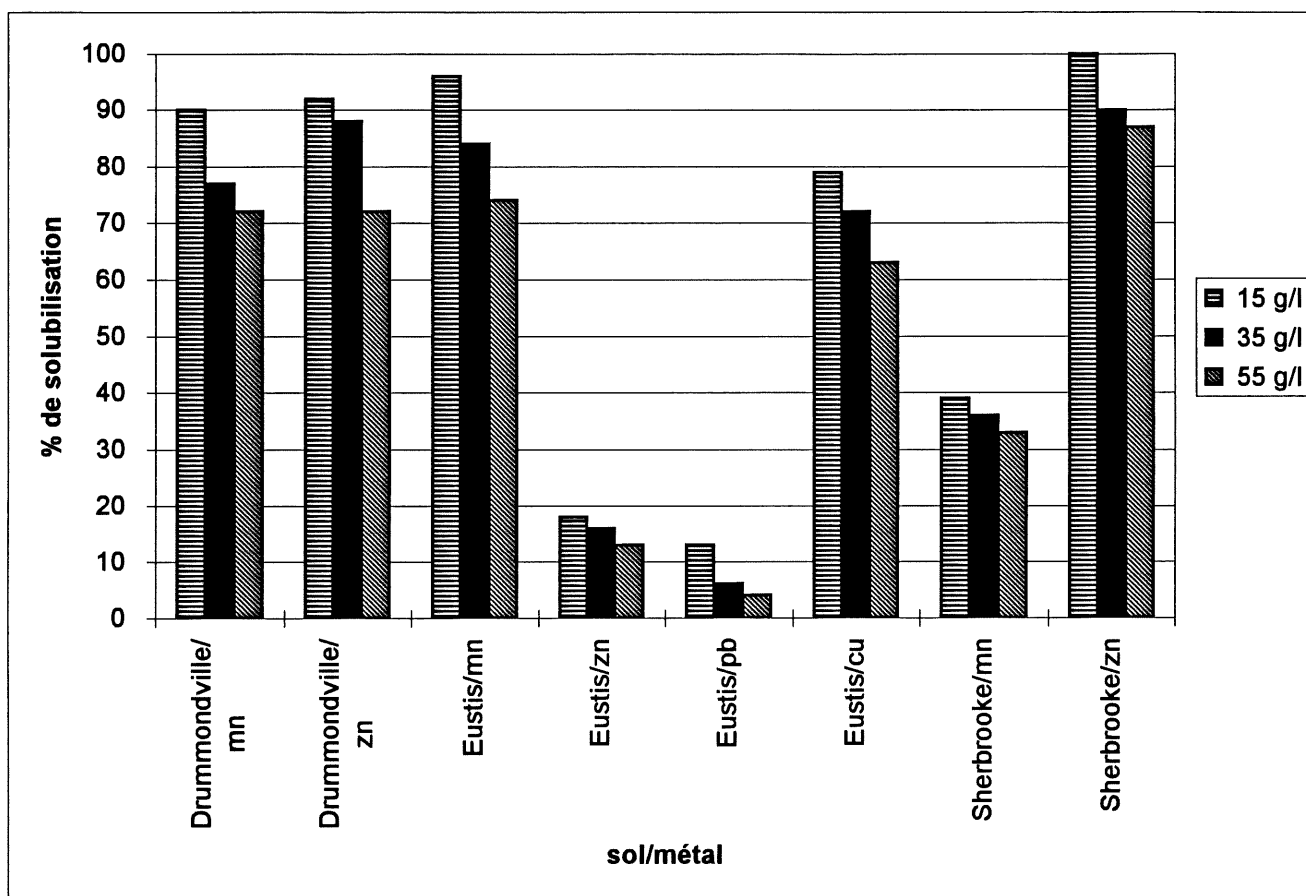


Figure 5.41: Influence du % de solide sur la solubilisation des métaux

quantité d'acide produite mais plutôt du pH résultant dans le milieu [66]. Cependant, d'autres facteurs semblent intervenir dans le processus de solubilisation puisque dans cette expérimentation, pour un même sol et un même métal étudié, le rendement de solubilisation était supérieur aux concentrations de solides plus faibles même lorsque le pH du milieu était équivalent.

5.6 Analyse au microscope électronique

Afin de confirmer la présence de thiobacilles, un examen microscopique des microfiores adaptées a été effectué. Les cellules bactériennes ont été traitées selon la méthode décrite au chapitre 4, puis examinées avec un microscope électronique (modèle JEOL JSM-840A). Cet examen a permis d'observer la présence de bactéries de forme et de dimension correspondant aux thiobacilles comme Thiobacillus thioparus et Thiobacillus thiooxidans soit des bâtonnets de 0,5 X 1,0 à 4,0 μm . Les microfiores des sols de Drummondville, Eustis et Sherbrooke ont été étudiées et photographiées et sont présentées aux figures 5.42a, 5.42b et 5.42c. Dans le cas du sol de Drummondville (figure 5.42a), étant donné la nature du sol lui-même, il a été très difficile de

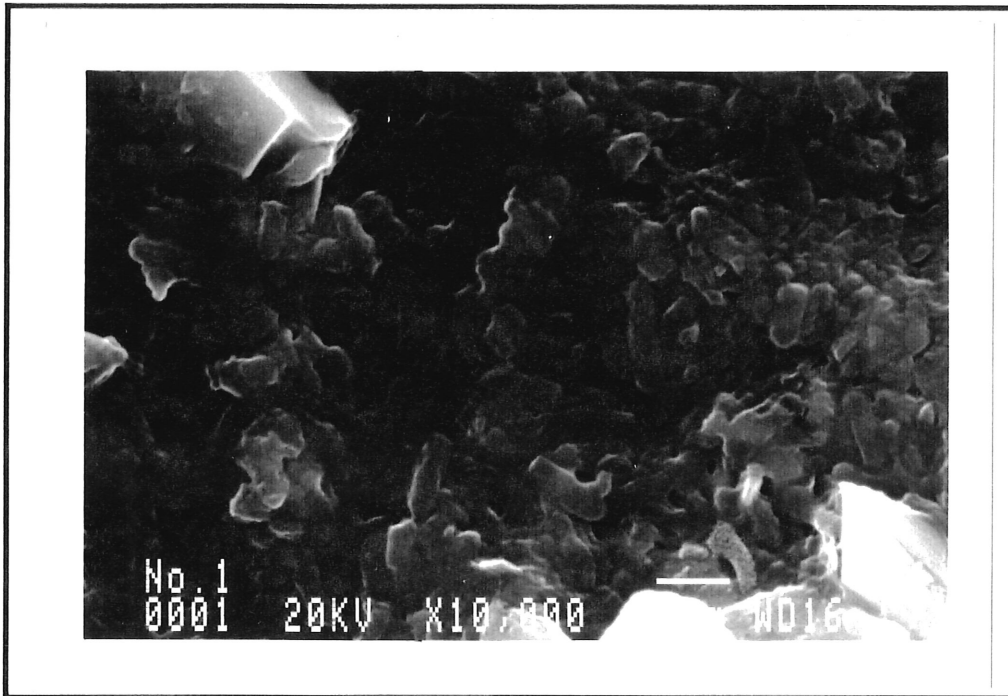


Figure 5,42a: Photographie au microscope électronique des thiobacilles du sol de Drummondville

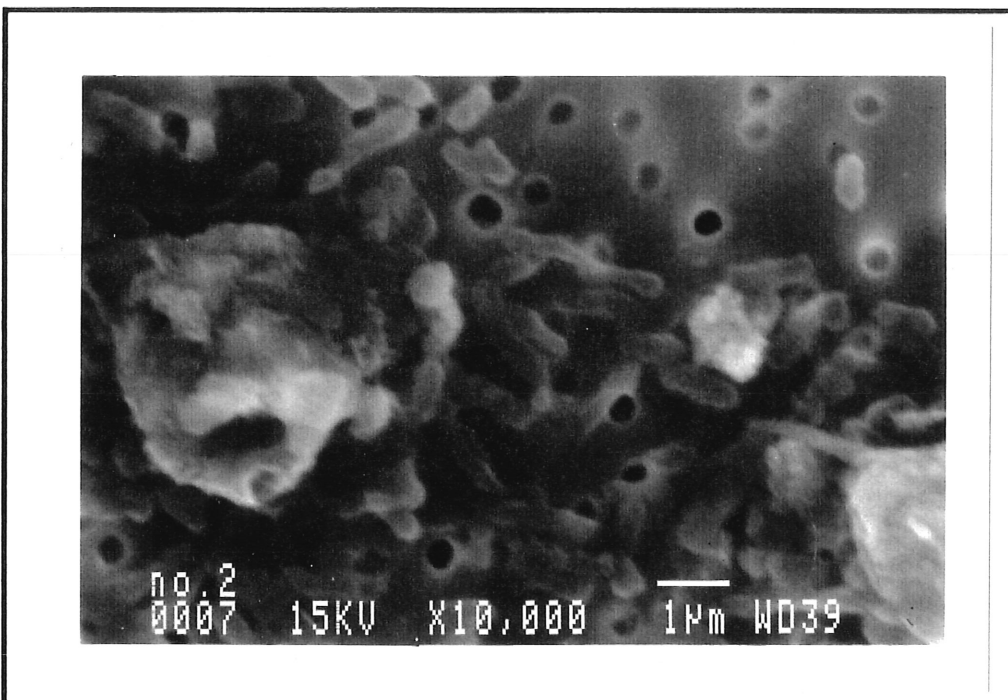


Figure 5,42b: Photographie au microscope électronique des thiobacilles du sol de Eustis

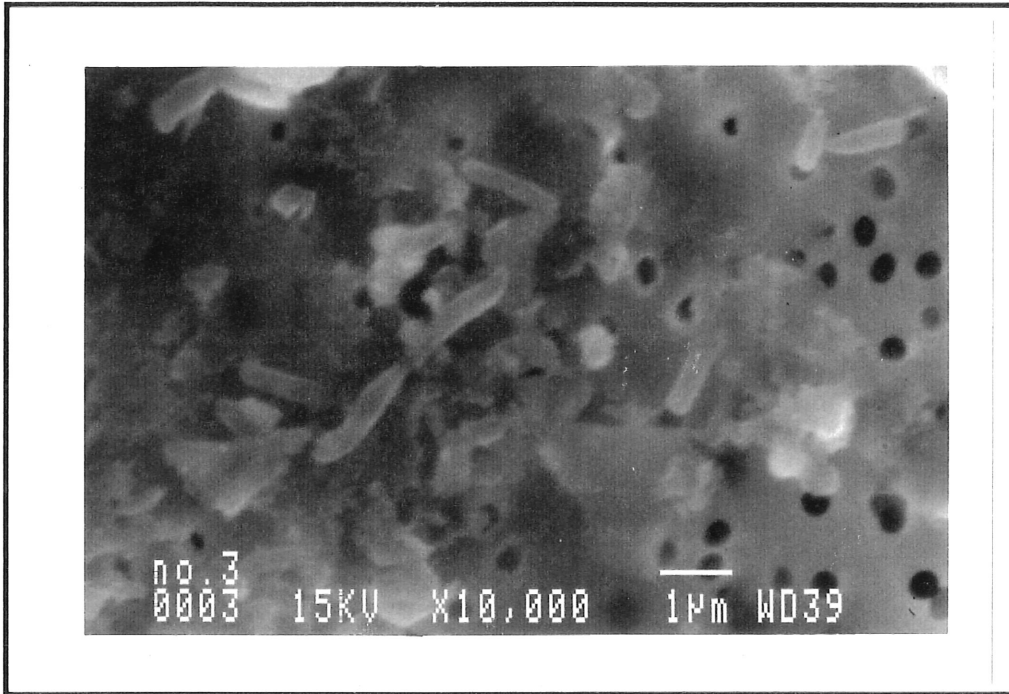


Figure 5,42c: Photographie au microscope électronique des thiobacilles du sol de Sherbrooke

distinguer les bactéries des autres particules. Par contre, pour les sols de Eustis (figure 5.42b) et Sherbrooke (5.42c), Les bactéries sont apparues plus clairement et se distinguent facilement de la matière environnante.

CONCLUSIONS

Le travail de recherche présenté dans les chapitres précédents a permis de développer certaines connaissances de base en biolixiviation des métaux dans les sols par la microflore indigène oxydant le soufre.

Tout d'abord, les travaux ont permis de constater qu'il est possible et relativement aisé d'adapter les bactéries indigènes oxydant le soufre présentes dans les sols contaminés avec comme substrat du soufre élémentaire en poudre. L'extraction des métaux dans les sols par biolixiviation peut donc être effectuée sans avoir recours à des souches bactériennes oxydant le soufre spécialisées comme celles provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). Cette caractéristique permet d'éviter les problèmes et les coûts reliés à l'achat, à l'acclimatation et au maintien en laboratoire de ces souches bactériennes. Les travaux ont également permis de constater qu'il est possible de conserver les microflores adaptées pendant une période d'au moins six mois de stockage à 4°C. Enfin, il suffit de quelques transferts successifs pour les réactiver afin de permettre la biolixiviation.

De plus, il a été constaté que les microflores oxydant le soufre indigènes peuvent être adaptées à différents types de sols aux caractéristiques physiques et chimiques variées. Parmi ces caractéristiques, on peut souligner qu'un contenu élevé en huiles

et graisses n'affecte pas le procédé de biolixiviation tel que démontré par les excellents résultats du sol de Drummondville qui contenait une concentration près du critère C du Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec (MEF). Les concentrations exceptionnelles en huiles et graisses comme celles du sol de Sherbrooke (plus de 4 fois le critère C du MEF) ne semblent affecter que légèrement la vitesse d'acidification du procédé mais n'influencent pas le rendement final de la solubilisation des métaux.

Quant à la valeur élevée du pH initial des sols (jusqu'à 7), elle n'inhibe pas la croissance des microorganismes et n'affecte pas le rendement de lessivage des métaux. Ceci est dû à l'action combinée de bactéries non-acidophiles et acidophiles. Ce facteur constitue un avantage économique par rapport à la biolixiviation utilisant le fer ferreux comme substrat puisque l'ajout d'acide n'est pas nécessaire afin d'ajuster le pH initial du sol.

Enfin, la capacité tampon est une caractéristique importante des sols qui peut avoir un effet négatif sur la biolixiviation. En effet, tel que démontré par le sol de Montréal, une capacité trop forte semble nuire à la chute de pH même s'il y a croissance de microorganismes biolixiviants et production d'acide. Ce facteur doit donc être considéré comme potentiellement limitatif de la technologie.

D'autre part, trois concentrations de solides dans le mélange ont été étudiées soient 15, 35 et 55 g/l. Cette étude a démontré

que l'augmentation du contenu en solides du mélange n'inhibe pas la croissance des microorganismes biolixiviants. La production de sulfate est même plus élevée avec les mélanges plus concentrés. Cependant, les résultats de la biolixiviation ont montré qu'une augmentation de la concentration de solides de 15 g/l à 55 g/l entraînait une réduction de l'efficacité de la solubilisation des métaux mais les taux de solubilisation demeurent élevés. L'explication de ce phénomène implique des mécanismes qui dépassent le cadre de ce travail. Dans des recherches ultérieures, il serait intéressant d'étudier une gamme plus large de concentrations, de trouver la concentration maximale à laquelle la biolixiviation demeure efficace et de rechercher l'explication des effets de la concentration de sol.

Enfin, cette étude a permis de démontrer le potentiel de la technologie de biolixiviation avec le soufre comme substrat dans le traitement des sols contaminés avec des métaux lourds. Après la biolixiviation, la partie liquide contenant les métaux lourds en solution dans le mélange peuvent être séparés du sol avec des méthodes standard de séparation liquides-solides comme la centrifugation, la décantation ou la filtration. Le pH du liquide séparé peut alors être ajusté à 10 à l'aide de chaux afin de précipiter les métaux [28,63]. Par la récupération des métaux précipités, il est possible de réduire les coûts du traitement.

Cependant, la présente étude a aussi mise en évidence

certaines limitations de la technologie. Il a été démontré entre autres que la spéciation des métaux dans les sols influence fortement l'efficacité du procédé. Ainsi, la biolixiviation dans un sol dont la majeure partie des métaux est sous forme résiduelle sera moins efficace que si les métaux sont sous une autre forme. Cependant, étant donné que la fraction résiduelle des métaux dans les sols ne représente qu'un faible degré de toxicité potentiel par rapport aux autres fractions en ce qui a trait à la mobilité du contaminant, la biolixiviation peut être considérée efficace malgré tout.

Le soufre élémentaire en poudre est peu dispendieux, ce qui rend son utilisation comme substrat avantageuse. Cependant, le rejet dans les sols d'une partie du soufre, non oxydé par le procédé, est peu souhaitable du point de vue environnemental entre autres parce que l'acidification du sol peut se poursuivre après que ce dernier ait été remis dans l'environnement. Afin de palier à ce problème, l'utilisation du soufre sous des formes récupérables comme des tablettes, sphères, blocs ou pastilles, telles que déjà étudiées en biolixiviation avec les boues d'épuration [63,78], devrait être envisagée.

Plusieurs autres facteurs pourraient être étudiés dans des recherches ultérieures comme la température. Blais et al. [64] ont déjà démontrés que la biolixiviation avec des boues pouvait être effectuée à des températures aussi basses que 7°C avec cependant

une efficacité réduite. Ce type d'expérimentation permettrait de vérifier si la technologie peut être utilisée avec les sols dans des conditions hivernales de basse température.

Des études microbiologiques plus poussées devraient aussi être effectuées afin de mieux comprendre et mieux contrôler les processus complexes de la biolixiviation.

Enfin, l'utilisation comme substrat d'autres composés soufrés réduits tels le sulfure d'hydrogène, le thiosulfate, le trithionate ou le tétrathionate pourrait aussi être étudiée afin d'améliorer l'efficacité du procédé au niveau économique et à celui de la solubilisation des métaux.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MANAHAN, S.E. (1991) *Environmental chemistry*, Chelsea, Michigan, USA, 5eme édition, Lewis Publishers, 583 p.
- [2] KABATA-PENDIAS, A., Pendias, H. (1984) *Trace elements in soils and plants*, Boca Raton, Florida, USA, 1e édition, CRC Press, 315 p.
- [3] MENVIQ, Ministère de l'Environnement du Québec, Direction des Substances Dangereuses. (1988) *Politique de Réhabilitation des Terrains Contaminés*, Sainte Foy, Envirodoq 880081, 54 p.
- [4] MENVIQ, Direction des Programmes de Gestion des Déchets et des Lieux Contaminés. (1996) *Banque de données des dossiers traités par le Ministère de l'Environnement dans le cadre de la Politique de Réhabilitation des terrains contaminés (GERSOL)*, Sainte Foy, N/Ref 5124-07-11
- [5] LEPP (annee), *Effects of heavy metal pollution on plants vol.1: effects of trace metal on plant function*, London and New Jersey, Applied Science Publishers, 352 p.
- [6] YONG, R.N., MOHAMED, A.M.O., WARKENTIN, B.P. (1992) *Principles of contaminant transport in soils*, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science Publishers B.V., 327 p.
- [7] WEBBER, M.D. (1986) *Epandage des boues d'épuration sur les terres agricoles, une évaluation*, Environnement Canada et Agriculture Canada, Comité d'experts sur la gestion des sols et de l'eau, Burlington, Ontario, 42 p.
- [8] SITTING, M. (1976) *Toxic metals, pollution control and worker protection*, Park Ridge, New Jersey, USA, Noyes Data Corporation, 350 p.
- [9] NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (1973) *Manganese, medical and biologic effects of atmospheric pollutants*, Division of Medical Sciences, National Research Council, Washington, D.C., USA, 191 p.
- [10] SCHALSCHA E.B. (1989) Heavy metal movement in irrigated soils. Dans *Encyclopedia of Environmental Technology*, vol. 3: *Wastewater treatment Technology*, Cheremisinoff, P.E. (éd.), Gulf Publishing Company, Texas, p. 543-556.
- [11] MANAHAN, S.E. (1989) *Toxicological chemistry, a guide to toxic substances in chemistry*, Chelsea, Michigan, USA, Lewis Publishers, 317 p.

- [12] DAVIS, R.D., CARLTON-SMITH, C.H. (1984) *An investigation into the phytotoxicity of zinc, copper and nickel using sewage sludge of controlled metal content*, Envir. Pollut., **B8**, p. 163-185.
- [13] MENVIQ (1988) *Guide d'implantation et de gestion des lieux d'enfouissement de sols contaminés*, Direction des Substances Dangereuses, Sainte Foy, Envirodoq 880116, 41 p.
- [14] WARREN, G.W., SREENIVASARAO, K., Mc KINLEY, M.D. (1990) *Hydrometallurgical treatment of hazardous waste, simultaneous detoxification and metal recovery*, Journal of Hazardous Materials, **24**, p. 309.
- [15] GHASSEMI, M. (1990) *In situ technologies for vadoze zone remediation*, Dans *Encyclopedia of Environment control technology*, vol. 4: Hazardous Waste Containment and Treatment, Cheremisinoff P.N. (éd.), Gulf, Texas, Library of Environmental Pollution Control Technology, p. 1-40.
- [16] HOLDEN, T., NEWTON, J., SYLVESTRI, P., DIAZ M., BAKER C., GUZMAN D. (1989) *How to select hazardous waste treatment technologies for soils and sludges*, New Jersey, Noyes Data Corporation, 150 p.
- [17] SIMS R.C. (1990) *Soil remediation techniques at uncontrolled hazardous waste sites, a critical review*, J. Air Waste Manage. Assoc., **40**, p. 704-732.
- [18] YONG R.N., PHADUNGWCHEWIT Y. (1993) *PH influence on selectivity and retention of heavy metals in some clay soils*, Canadian Geotechnical Journal, **30**, p. 821-833.
- [19] CAIRNEY T. (1987) *Reclaiming contaminated land*, London, Blackie and son, 260 p.
- [20] PETITPAS A. (1989) *Revue des techniques existantes et proposées pour le traitement et l'élimination des déchets dangereux inorganiques et des sols contaminés aux substances inorganiques*, Rapport final soumis à la commission d'enquête sur les déchets dangereux, MENVIQ, 97 p.
- [21] CUNNINGHAM S.D., BERTI W.R. (1993) *Phytoremediation of contaminated soils: progress and promise*, Preprints of the Symposium on Bioremediation and Bioprocessing presented before the Division of Petroleum Chemistry of the American Chemical Society, Denver, Colorado, USA, **38**, p.265-268.
- [22] BERTHELIN J. (1987) *Des bactéries pour extraire des métaux*, La Recherche, **188**, p. 720-725.

- [23] LUNDGREN D.G., SILVER M. (1980) *Ore leaching by bacteria*, Ann. Rev. Microbiol., **34**, p. 263-283.
- [24] WONG L., HENRY J.G. (1983) *Bacterial leaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge*, Wat. Pollut. Res. J. Can., **18**, p. 151-162.
- [25] HUTCHINS S.R., DAVIDSON M.S., BRIERLEY J.A., BRIERLEY C.L. (1986) *Microorganisms in reclamation of metals*, Ann. Rev. Microbiol., **40**, p. 311-336.
- [26] TORMA A.E. (1985) Biohydrometallurgy as an emerging technology, dans *Workshop on biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries, Biotechnology and Bioengineering Symp. No 16*, New York, Ehrlich H.L. and Holmes D.S. (éds), John Wiley and Sons inc., p. 49-63.
- [27] LUNDGREN D.G., VALKOVA-VALCHANOVA M., REED R. (1985) Chemical reactions important in bioleaching and bioaccumulation, dans *Workshop on biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries, Biotechnology and Bioengineering Symp. No 16*, New York, Ehrlich H.L. and Holmes D.S. (éds), John Wiley and Sons inc., p. 7-22.
- [28] TYAGI R.D., COUILLARD D. (1989) Bacterial leaching of metals from sludge, dans *Encyclopedia of environment control technology*, Vol. 3: *Wastewater treatment technology*, Cheremisinoff P.E. (éd.), Texas, Gulf Publishing Company, p. 557-591.
- [29] KELLY D.P., HARRISON A.P. (1988) Genus *Thiobacillus*, dans *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Holt, J.G., Staley J.T., Bryant M.P., Pfennig (éds), Baltimore, MD, USA, Williams and Wilkins Co., p. 1842-1858.
- [30] SUZUKI I. (1974) *Mechanisms of inorganic oxidation and energy coupling*, Ann. Rev. Microbiol., **28**, p. 85-101.
- [31] BLAIS J.F., TYAGI R.D., AUCLAIR J.C. (1993) *Bioleaching of metals from sewage sludge: microorganisms and growth kinetics*, Water Research, **27**, p. 101-110.
- [32] (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Holt, J.G., Staley J.T., Bryant M.P., Pfennig (éds), Baltimore, MD, USA, Williams and Wilkins Co., p.
- [33] COLMER A.R., HINKLE M.E. (1947) *The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report*, Science, **106**, p. 253-256.

- [34] ADAIR F.W., GUNDERSEN K. (1969) Chemoautotrophic sulfur bacteria in the marine environment. I. Isolation, cultivation and distribution, Can. J. Microbiol., **15**, p. 345-353.
- [35] DUGAN P.R., APEL W.A. (1978) Microbiological desulfurization of coal, dans *metallurgical applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena*, Murr L.E., Torma A.E., Brierley J.A. (éds), New York, Academic Press, p. 223-250.
- [36] DUGAN P.R. (1985) Microbiological desulfurization of coal and its increased monetary value, dans *Workshop on biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries, Biotechnology and Bioengineering Symp. No 16*, New York, Ehrlich H.L. and Holmes D.S. (éds), John Wiley and Sons inc., p. 185-204.
- [37] BOS P., KUENEN J.G. (1990) Microbial treatment of coal, dans *Microbial Mineral Recovery*, Ehrlich H.L., Brierley C.L. (éds), New York, McGraw-Hill Publishing Company, p. 105-120.
- [38] HOFFMANN M.R., FAUST B.C., PANDA F.A., KOO H.H., TSUCHIYA H.M. (1981) Kinetics of the removal of iron pyrite from coal by microbial catalysis, Appl. Environ. Microbiol., **42**, p. 259-271.
- [39] FOGHT J.M., FEDORAK P.M., GRAY M.R., WESTLAKE D.W.S. Microbial desulfurization of petroleum, dans *Microbial Mineral Recovery*, Ehrlich H.L., Brierley C.L. (éds), New York, McGraw-Hill Publishing Company, p. 379-408.
- [40] FINNERTY W.R., ROBINSON M. (1985) microbial desulfurization of fossil fuels: a review, dans *Workshop on biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries, Biotechnology and Bioengineering Symp. No 16*, New York, Ehrlich H.L. and Holmes D.S. (éds), John Wiley and Sons inc., p. 205-221.
- [41] SUBLETTE K.L., SYLVESTER N.D. (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by Thiobacillus denitrificans: Desulfurization of natural gas, Biotechnol. Bioeng., **29**, p. 249-257.
- [42] STRAYER R.F., DAVIS E.C. (1983) Reduced sulfur in ashes and slags from the gasification of coals: Availability for chemical and microbial oxidation, Appl. Environ. Microbiol., **45**, p. 743-747.
- [43] COUILLARD D., CHARTIER M. (1993) Décontamination biologique des sédiments pollués par les métaux lourds: Etude de l'influence du substrat, de la teneur en solides totaux et de la température, Environmental Technology, **14**, p. 919-930.

- [44] BOSECKER K., KÜRSTEN M. (octobre 1978) *Recovery of metallic raw materials by microbial leaching*, Process Biochemistry, p. 2-4.
- [45] ROSSI G., EHRLICH H.L. (1990) Other bioleaching processes, dans *Microbial Mineral Recovery*, Ehrlich H.L., Brierley C.L. (éds), New York, McGraw-Hill Publishing Company, p. 379-408.
- [46] BOSECKER K. (1985) Bacterial metal recovery and detoxification of industrial waste, dans *Workshop on biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries, Biotechnology and Bioengineering Symp. No 16*, New York, Ehrlich H.L. and Holmes D.S. (éds), John Wiley and Sons inc., p. 105-120.
- [47] HOLMES D.S. (1991) Biorecovery of metals from mining, industrial and urban wastes, dans *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*, Martin A.M. (éd.), New York, Elsevier Applied Science, p. 441-474.
- [48] EBNER H.G. (1978) Metal recovery and environmental protection by bacterial leaching of inorganic waste materials, dans *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena*, Murr L.E., Torma A.E., Brierley J.A. (éds), New York, Academic Press, p. 195-206.
- [49] LAWRENCE R.W. (1990) Biotreatment of gold ores, dans *Microbial Mineral Recovery*, Ehrlich H.L., Brierley C.L. (éds), New York, McGraw-Hill Publishing Company, p. 127-148.
- [50] SCHÖNBORN W., HARTMANN H. (1978) Bacterial leaching of metals from sewage sludge, Eur. J. Appl. Microbiol., 5, p. 305-313.
- [51] WONG L., HENRY J.G. (1984) decontaminating biological sludge for agricultural use, Wat. Sci. Technol., 17, p. 575-586.
- [52] TYAGI R.D., COUILLARD D. (1987) Bacterial leaching of metal from digested sewage sludge, Proc. Biochem., 22, p. 114-117.
- [53] TYAGI R.D., COUILLARD D., TRAN F.T. (1988) Heavy metals removal from anaerobically digested sludge by chemical and microbiological methods, Environ. Pollut., 50, p. 295-316.
- [54] TYAGI R.D., COUILLARD D., TRAN F.T. (1990) Studies on microbial leaching of heavy metals from municipal sludge, Water Sci. Technol., 22, p. 229-238.
- [55] COUILLARD D., MERCIER G. (1990) Bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge - bioreactors comparison, Environ. Pollut., 66, p. 237-252.

- [56] COUILLARD D., MERCIER G. (1991) Optimum residence time (in CSTR and airlift reactor) for bacterial leaching of metals from sewage sludge, Water Research, 25, p. 211-218.
- [57] TYAGI R.D., TRAN F.T. (1991) Microbial leaching of metals from digested sewage sludge in continuous system, Environ. Technol., 12, p. 303-312.
- [58] COUILLARD D., CHARTIER M. (1991) Removal of metals from aerobic sludges by biological solubilization in batch reactors, J. Biotechnol., 20, p. 163-180.
- [59] COUILLARD D., MERCIER G. (1991) Procédé de solubilisation biologique des métaux dans les boues anaérobies d'épuration: filtrabilité, neutralisation et teneurs en N et P des boues traitées, Can. J. Chem. Eng., 69, p. 779-787.
- [60] BLAIS J.F., TYAGI R.D., AUCLAIR J.C. (1993) Metals removal from sewage sludge by indigenous iron-oxidizing bacteria, J. Environ. Sci. Health, A28(2), p. 443-467.
- [61] JAIN D.K., TYAGI R.D. (1992) Heavy metals leaching from anaerobic sewage sludges by sulphur-oxidizing bacteria, Enzym. Microbiol. Technol., 14, p. 376-383.
- [62] BLAIS J.F., AUCLAIR J.C., TYAGI R.D. (1992) Cooperation between two Thiobacillus strains for heavy-metal removal from municipal sludge, Can. J. Microbiol., 38, p. 181-187.
- [63] BLAIS J.F., TYAGI R.D., AUCLAIR J.C. (1992) Bioleaching of metals from sewage sludge by sulfur-oxidizing bacteria, J. Environ. Eng., 118, p. 690-707.
- [64] BLAIS J.F., TYAGI R.D., AUCLAIR J.C. (1993) Bioleaching of metals from sewage sludge: effects of temperature, Water Research, 27, p. 111-120.
- [65] TYAGI R.D., SREEKRISHNAN T.R., BLAIS J.F., CAMPBELL P.G.C. (1994) Kinetics of heavy metal bioleaching from sewage sludge-III. Temperature effects, Water Research, 28, p. 2367-2375.
- [66] SREEKRISHNAN T.R., TYAGI R.D., BLAIS J.F., CAMPBELL P.G.C. (1993) Kinetics of heavy metal bioleaching from sewage sludge-I. Effects of process parameters, Water Research, 27, p. 1641-1651.
- [67] ZAGURY G.J., NARASIAH K.S., TYAGI R.D. (1994) Adaptation of indigenous iron-oxidizing bacteria for bioleaching of heavy metals in contaminated soils, Environ. Technol., 15, p. 517-530.

- [68] MENVIQ, Ministère de l'Environnement du Québec, (1990) *Guide des méthodes de conservation et d'analyse des échantillons d'eau et de sol*, Direction des Laboratoires, Envirodoq EN900080, 93 p.
- [69] AGRICULTURE CANADA, Direction Générale de la Recherche (1984) *Analytical methods manual*, Land Resource Research Institute, Sheldrick B.H. (éd.), Ottawa, 49 p.
- [70] APHA, AWWA and WEF (1992) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18ème édition, American Public Health Association, Washington D.C.
- [71] FEDERER C.A., HORNBECK J.W. (1985) *The buffer capacity of forest soils in New England*, Wat. Air Soil Pollut. 26, p. 163-173.
- [72] PELCZAR M.J., REID R.D. (1972) *Microbiology*, New York, McGraw-Hill Book Company, 948 p.
- [73] SILVERMAN M.P., LUNDGREN D.G. (1959) *Studies on the chemoautotrophic iron bacterium Thiobacillus ferrooxidans I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields*, J. Bacteriol., 77, p. 642-647.
- [74] WILBER C.G. (1969) *The biological aspects of water pollution*, Springfield, Illinois, USA, Charles C Thomas Publisher, 296 p.
- [75] WARREN C. E. (1971) *Biology and Water Pollution Control*, Philadelphia, USA, W.B. Saunders Company, 434 p.
- [76] CHEREMISINOFF P.N., TRATTNER R.B., TABAKIN R.B. (1989) *Oil/water separation treatment technology*, dans *Encyclopedia of environment control technology*, Vol. 3: *Wastewater treatment technology*, Cheremisinoff P.E. (éd.), Texas, Gulf Publishing Company, p. 355-366.
- [77] TESSIER A., CAMPBELL P.G.C., BISSON M. (1979) *Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals*, Analytical Chemistry, 51, p. 844-851.
- [78] RAVISHANKAR B.R., BLAIS J.F., BENMOUSSA H., TYAGI R.D. (1994) *Bioleaching of metals from sewage sludge: elemental sulfur recovery*, Journal of environmental engineering, 120, p. 462-470.